ZENO GÂRBAN

BIOLOGIE MOLECULARĂ

Ediția 5-a

III 283.810

EDITURA EUROBIT TIMIŞOARA

BCU IAŞI/CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

BIBL. CENTR. UNIV.
„M. EMINESCU" IAŞI
III 283.810

BCU IAŞI/CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

BIOLOGIE MOLECULARĂ

BCU IASI/CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Descrierea CIP a Bibliotecii Naţionale

Gârban Zeno
BIOLOGIE MOLECULARĂ
Editura Eurobit Timişoara
Ediţia 5-a rev., 2005
LVI + 534 p; il; 24 cm
Bibliogr.; Index

ISBN 973 - 620 - 159 - 7

581.2

BCU IAŞI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

ZENO GÂRBAN

BIOLOGIE MOLECULARĂ

Ediția 5-a

Volum publicat în cadrul Proiectului "Biotechnology Thematic Network", finanțat de Uniunea Europeană, derulat sub conducerea Universității Perugia - Italia (Prof. Dr. M. V. Magni) și reprezintă contribuția adusă - în calitate de co-participant la Proiect - de Departamentul de Biochimie-Biologie moleculară (Prof. Dr. Z. Gârban) de la Facultatea de Tehnologia Produselor Agroalimentare, Universitatea de Științe Agricole și Medicină Veterinară a Banatului Timișoara, Romania

ALE

386890
B.C.U. IASI

EDITURA EUROBIT TIMIŞOARA

Zeno Gârban

Biologie moleculară (Ediția 5-a)

Partea I. Concepte și metode generale;
Partea II. Metode specifice biologiei moleculare;
Partea III. Aplicații ale biologiei moleculare

Molecular Biology (5th Edition)

Part I. General concepts and methods;
Part II. Specific methods for molecular biology;
Part III. Applications of molecular biology

Publicare:
Ediția 1-a Biologie moleculară : Noțiuni, concepte, metode Vol. I, 1992; Vol. II, 1994
Ediția 2-a Biologie moleculară : Noțiuni, concepte, metode Vol. I-II, 1997 (Tiraje 1; 2)
Ediția 3-a Biologie moleculară : Probleme fundamentale și aplicative, 1998 (Tiraj 1; 2)
Ediția 4-a Biologie moleculară : Probleme fundamentale și aplicative, 2001 (Tiraj 1; 2; 3)
Volum distins de Academia Română cu premiul "Traian Săvulescu"
Ediția 5-a Biologie moleculară, 2005

Tehnoredactare computerizată consiliată de:
Drd. Adina Avacovici

© Copyright Zeno Gârban

Copierea, fotocopierea, transmiterea prin mijloace electronice sau înregistrarea audio a conținutului acestui volum se poate face doar cu acordul scris al autorului.

ISBN 973 - 620 - 159 - 7

Editura "Eurobit" Timișoara
Aleea F.C. Ripensia Nr. 10
300.575 Timișoara

- 2 DEC. 2005

In memoriam

Acad. Nicolae CAJAL
(1 octombrie 1919 – 7 martie 2004)

BCU IASI/CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

BCU IASI/CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

PREFAȚĂ

Biologia moleculară contemporană abordează o arie tematică tot mai vastă, cu extinderea continuă a domeniilor teoretice şi practice. Prezentul volum readuce în atenţie "sferele de interes" pentru cercetarea ştiinţifică fundamentală şi aplicativă, şi extinde problematica biotehnologiilor moderne. În acest context se impune aprofundarea studiului «organismelor modificate genetic», constituindu-se ca o aplicaţie a biologiei moleculare cu largi repercusiuni asupra nutriţiei, farmacologiei, agrobiologiei, biologiei medicale, patologiei, terapiei genice etc.

Publicarea acestui volum se face în cadrul contribuţiei la Proiectul "Biotechnology Thematic Network", finanţat de Uniunea Europeană, derulat sub conducerea Departamentului de Biochimie şi Biotehnologie moleculară al Universităţii Perugia -Italia (Prof. Dr. Mariapia Viola Magni) şi reprezintă aportul adus - în calitate de co-participant la Proiect - de Departamentul de Biochimie-Biologie moleculară (Prof. Dr. Z. Gârban) de la Facultatea de Tehnologia Produselor Agroalimentare, Universitatea de Ştiinţe Agricole şi Medicină Veterinară a Banatului (S.A.M.V.B.) Timişoara - România. Cooptarea autorului acestui volum la Proiectul amintit, cu participarea unor comunităţi ştiinţifice din 24 ţări din Europa (România este reprezentată prin Universitatea "Al. I. Cuza" din Iaşi şi Universitatea "S.A.M.V.B." din Timişoara) s-a făcut la propunerea Prof. Dr. M. V. Magni şi a fost confirmată de Rectoratul Universităţii "S.A.M.V.B." Timişoara prin «Letter of Agreement» (4.750 / 30.12.1999).

Volumul acesta este dedicat memoriei magistrului şi mentorului meu în probleme de Biologie moleculară şi Biochimia acizilor nucleici - regretatul Acad. Nicolae Cajal (1919-2004). Am avut onoarea şi satisfacţia profesională de a-l avea îndrumător în momente în care în România teme privind acizii nucleici erau studiate la Institutul de Virusologie "Şt. S. Nicolau" şi la Institutul de Sănătate Publică Timişoara -

BUASVM TIMIŞOARA UNIVERSITY LIBRARY

Laboratorul de Embriologie, Departamentul de Biochimie (fapt constatabil din lucrările publicate în deceniul 1980-1990)

Remarcabil pentru înalta ţinută socio-profesională a distinsului mentor, este şi faptul că în 1993, în calitate de vicepreşedinte al Academiei Române (mandatul 1990-1994), cunoscând publicaţiile noastre în domeniul acizilor nucleici şi metalelor - a avizat iniţierea Seriei de Simpozioane internaţionale privind metalele în mediu, medicină şi biologie. Organizarea acestora s-a făcut sub egida Academiei Române - Comisia de Biochimie (Acad. Mihai Şerban). Manifestările ştiinţifice s-au desfăşurat în cadrul Filialei Timişoara a Academiei Române (preşedinte Acad. Toma Dordea), cu sprijinul D-lor rectori de la universităţile timişorene. Seria de Simpozioane care se continuă şi în prezent, are un caracter dienal, iar lucrările ştiinţifice prezentate în perioada 1994-2004 au fost publicate în şase volume: «Metal Elements in Environment, Medicine and Biology» (Tome I - VI). La organizarea acestor simpozioane internaţionale am cooperat cu Prof. Dr. Petru Drăgan de la Universitatea de Medicină şi Farmacie "Victor Babeş" Timişoara.

Scrierea acestei prefeţe se face într-o zi care aş fi dorit-o omagiată «in vita et pro personam», dar care se constituie drept omagiu «in memoriam» pentru ilustrul mentor, care a înţeles sensul devenirii Biologiei moleculare ca ştiinţă interdisciplinară, promovând-o atât în Institutul de Virusologie "Şt. S. Nicolau" pe care l-a condus extinzându-i mult reputaţia, cât şi în alte institute de cercetare sau universităţi. Sprijinul primit personal, m-a onorat şi, în acelaşi timp, m-a obligat la menţinerea - atât cât mi-a fost posibil - a nivelului ştiinţific în acest domeniu.

Timişoara, 2004 octombrie 1

Zeno Gârban

BCU IASI/CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

PREFAȚĂ LA BIOLOGIE MOLECULARĂ: PROBLEME FUNDAMENTALE ȘI APLICATIVE EDITURA EUROBIT, TIMIȘOARA (2001)

Elaborarea unui volum care abordează probleme de Biologie moleculară – reprezintă o problemă complexă în condițiile exploziei informaționale care marchează progresele din acest domeniu.

Exigențele ridicate în prezent de vasta problematică din Biologia moleculară vizând cercetarea fundamentală și aplicativă (biologie, medicină, nutriție, farmacie, agrobiologie, industrii cu profil biotehnologic etc.) au condus la acreditarea ideii de reeditare a volumului "Biologie moleculară: Probleme fundamentale și aplicative". Acest volum încearcă să suplinească lipsa unui tratat de specialitate și reprezintă o transpunere în actualitate a ediției precedente.

La finalizarea acestei modeste contribuții, gândul se îndreaptă cu gratitudine spre distinsul Acad. N. Cajal. În 1984, Domnia-Sa – la recomandarea regretatului Prof. Dr. doc. B. Menkes, membru corespondent al Academiei Române – mi-a oferit șansa unei specializări care a sumat două luni în cadrul Institutului de Virusologie "St. S. Nicolau" din București. Ulterior, Acad. N. Cajal - în calitate de vicepreședinte al Academiei Române, a încurajat și sprijinit continuarea activității în domeniul Biochimiei acizilor nucleici și Biologiei moleculare.

Mulțumiri și sentimente de înaltă considerație exprim, de asemenea, eminentului Acad. P. Brânzeu, la sugestia D-sale orientându-mi activitatea – încă din 1974 – spre problematica cercetării biomedicale în relație cu Biochimia acizilor nucleici.

Retrospectiv se menționează faptul că cercetări inițiate încă din anii '73 în Biochimia acizilor nucleici privind interacția cu ioni metalici, au fost sprijinite de Acad. I. Haiduc - vicepreședinte al Academiei Române, căruia îi exprim înaltă stimă și considerație.

Studiile întreprinse alături de Prof. Dr. H. Mantsch, Prof. Asoc. Dr. doc. F. Hodoșan (perioada clujeană) au fost orientate și aprofundate (perioada timișoreană) în direcția aplicării în domeniul biomedical: biochimia acizilor nucleici, chimia bioanorganică, farmaco-toxicologie, embriologie experimentală, chimioterapie citostatică, încadrându-se, în parte, în problematica Biologiei moleculare.

În defășurarea activității de cercetare științifică în perioada timișoreană investigațiile asupra interacției acizilor nucleici cu chimioterapice citostatice au beneficiat de încurajarea și sprijinul dat de Prof. Dr. Gh. Băcanu - președinte al Filialei Timișoara a Academiei de Științe Medicale (A.S.M.). În calitate de rector al Universității de Medicină (fost Institutul de Medicină) Timișoara, D-Sa a supervizat temele de cercetare departamentală desfășurate sub egida A.S.M. (1980-1990), implicit temele de la Laboratorul de Embriologie – Departamentul de Biochimie (coordonat de subsemnatul) de la Institutul de Sănătate Publică (fost Centrul de Igienă și Sănătate Publică) Timișoara.

Elaborarea acestui volum este tributară unei activități susținute în cercetarea științifică asupra acizilor nucleici, extinderii documentării de specialitate, precum și schimbului de informații științifice prilejuit de participarea autorului la cursul "Applications of DNA Method for Diagnosis of Human Disease" organizat sub auspiciile Federației Societăților Europene de Biochimie – FEBS (Federation of European Biochemical Societies), desfășurat la Universitatea din Patras-Grecia, în perioada 9-19 mai 1991 (Assoc. Prof. Dr. A. Athanassiadou, Prof. Dr. G. M. Maniatis).

De asemenea, ca invitat în calitate de visiting-profesor (martie 1994), un important sprijin documentar mi-a fost oferit de Universitatea "JATE" din Szeged-Ungaria şi Institutul de Biotehnologie din Szeged (Prof. Dr. J. Nemcsok, Dr. doc. A.S. Kiss) şi de Universitatea "Friedrich Schiller" Jena (decembrie 1995) prin Institutul de Cercetări pentru Mediu şi Toxicologie (Prof. Dr. M. Anke). În documentare, o reală şansă a fost reprezentată de vizitarea laboratoarelor de profil (septembrie 1997) din Departamentul de Chimie şi Biochimie (Prof. Dr. E. Reisler) şi din Institutul de Biologie Moleculară (Prof. Dr. R. E. Dickerson) de la UCLA – Universitatea din California, Los Angeles – USA. La vizitarea diverselor laboratoare şi discuţiile de specialitate cu personalităţi ale vieţii ştiinţifice din aceste universităţi s-a adăugat şi documentarea efectuată în diverse biblioteci din străinătate.

M-am simţit onorat şi obligat în continuarea activităţii redacţionale de aprecierile favorabile făcute volumului "Noţiuni de Biologie moleculară" (ediţia 2-a) de către Acad. Maya Simionescu – vicepreşedintă a Academiei Române, la Sesiunea Anuală în iunie 1997 a Societăţii Naţionale de Biologie Celulară.

De asemenea, aprecieri favorabile cu referire la ediţiile apărute şi sugestii importante au exprimat Acad. G. Zarnea, Acad. V.E. Sahini şi Prof. Dr. G. Benga – membru titular al Academiei de Ştiinţe Medicale, de la U.M.F. "Iuliu Haţieganu" Cluj-Napoca.

Redactarea primei părţi a acestui volum se datorează într-o importantă măsură sprijinului indirect acordat de conducerea Universităţii de Ştiinţe Agricole şi Medicină Veterinară a Banatului Timişoara, prin includerea în Planul de învăţământ a unui curs de specialitate cu profil de Biologie moleculară pentru specializarea absolvenţilor în domeniul Biotehnologiei. Acest curs, predat de subsemnatul, începând încă din anul universitar 1990/1991 s-a aflat la originea elaborării primei ediţii din Biologia moleculară Vol. I (1992) şi Vol. II (1994).

Sentimente de recunoştinţă adresez, de asemenea, Prof. Dr. doc. S. Sandor – membru titular al Academiei de Ştiinţe Medicale. Alături de D-sa am aprofundat domeniul cercetărilor experimentale pe animale de laborator. În fine, dar nu în ultimul rând, se menţionează rolul regretatului Prof. Dr. doc. V. Pintea care – în perioada de activitate a subsemnatului ca preparator universitar la Disciplina de Fiziologie animală comparată – m-a iniţiat în astfel de cercetări cu aplicabilitate în Fiziologie şi Biochimie.

Deşi unele cercetări referitoare la acizii nucleici (in vitro şi in vivo) au fost publicate încă în anii '82, publicarea unui volum de Biologie moleculară a fost temporizată. Astfel a devenit posibilă extinderea şi aprofundarea informaţiilor cu caracter teoretic şi aplicativ apelând la noi tratate de specialitate, manuale de laborator şi reviste (periodice) diverse. La toate acestea s-a adăugat literatura de specialitate acumulată într-o perioadă de peste două decenii.

Consider că m-am apropiat de obiectivele propuse dacă am reuşit să imprim acestei cărţi un caracter unitar – unitate în diversitate – relevând principalele aspecte fundamentale şi aplicative, în continuă perfectare.

Conştient de lipsurile inerente unei astfel de întreprinderi şi perfectibilitatea acesteia, rămân receptiv - exprimându-mi gratitudinea - faţă de orice sugestie pertinentă, menită a contribui la îmbunătăţirea materialului expus.

Timişoara, 2001 iunie 15

Zeno Gârban

CUPRINS GENERAL

PARTEA I. CONCEPTE ŞI METODE GENERALE 1
1. Biologia moleculară în studiul materiei vii 3
2. Investigarea ultrastructurii şi bioconstituenţilor 89
3. Acizii nucleici: structură chimică-activitate biologică 157
4. Acizii nucleici în biologia moleculară modernă 223
Referinţe bibliografice (selective) 239

PARTEA II. METODE SPECIFICE BIOLOGIEI MOLECULARE 243
5. Genomul şi organizarea genică a materiei vii 245
6. Investigarea acizilor nucleici 287
7. Recombinarea genică naturală 341
8. Recombinarea genică mediată biotehnologic 357
Referinţe bibliografice (selective) 383

PARTEA III. APLICAŢII ALE BIOLOGIEI MOLECULARE 389
9. Aplicaţii în biotehnologie 391
10. Aplicaţii cu specific biomedical 429
11. Aplicaţii de interes cronobiochimic 441
12. Aplicaţii în studiul xenobioticelor 459
Referinţe bibliografice (selective) 499

Addenda 509
Glosar minimal 515
Index de subiecte 527

BCU ALEXANDRU IOAN CUZA UNIVERSITY LIBRARY

GENERAL CONTENTS

PART I. GENERAL CONCEPTS AND METHODS 1
1. Molecular biology in the study of the living matter 3
2. Investigation of ultrastructure and bioconstituents 89
3. Nucleic acids: chemical structure-biological activity 157
4. Nucleic acids in modern molecular biology 223
References (selective) 239

PART II. SPECIFIC METHODS IN MOLECULAR BIOLOGY 243
5. Genome and genic organization of living matter 245
6. Investigation of nucleic acids 287
7. Natural genic recombination 341
8. Biotechnologically mediated genic recombination 357
References (selective) 383

PART III. APPLICATIONS OF MOLECULAR BIOLOGY 389
9. Applications in biotechnology 391
10. Applications of biomedical interest 429
11. Applications of chronobiochemical interest 441
12. Applications in the study of xenobiotics 459
References (selective) 499

Addenda 509
Minimal glossary 515
Subject index 527

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

INHALTSVERZEICHNIS

TEIL I. ALLGEMEINE KONZEPTE UND METHODEN 1
1. Molekularbiologie zum Studie des lebendigen Stoffes 3
2. Nachforschung über die Ultrastruktur und die Biokonstituenten 89
3. Nukleinsäuren: chemische Struktur und biologische Aktivität 157
4. Nukleinsäuren in die moderne Molekularbiologie 223
Bibliographie (selektiv) 239

TEIL II. SPEZIFISCHE METHODEN DER MOLEKULARBIOLOGIE . 243
5. Genom und genische Organisierung des lebendigen Stoffes 245
6. Nachforschung der Nukleinsäure 287
7. Naturelle Generekombination 341
8. Biotechnologisch vermittelte Generekombination 357
Bibliographie (selektiv) 383

TEIL III. ANWENDUNGEN DER MOLEKULARBIOLOGIE 389
9. Biotechnologische Anwendungen 391
10. Biomedizinische Anwendungen 429
11. Chronobiochemische Anwendungen 441
12. Anwendungen in der Studie der Xenobiotika 459
Bibliographie (selektiv) 499

Addenda 509
Glossar 515
Index 527

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

SOMMAIRE ABREGE

I.-ère PARTIE. CONCEPTS ET MÉTHODES GÉNÉRALES 1
1. Biologie moléculaire dans l'é tude de la matière vivante 3
2. Investigation d`ultrastructure et des bioconstituents 89
3. Acides nucléiques: structure chimique-activité biologique 157
4. Acides nucléiques dans la biologie moléculaire moderne 223
Bibliographie (sélective) 239

II.-ème PARTIE. MÉTHODES SPÉCIFIQUES POUR LA BIOLOGIE MOLÉCULAIRE 243
5. Le génome et l`organisation génique de la matière vivante 245
6. Investigation des acides nucléiques 287
7. Recombinaison génique naturelle 341
8. Recombinaison génique par la médiation de la biotechnologie 357
Bibliographie (sélective) 383

III.-ème PARTIE. APPLICATIONS DE LA BIOLOGIE MOLÉCULAIRE 389
9. Applications biotechnologiques 391
10. Applications biomédicales 429
11. Applications a intérêt chronobiochimique 441
12. Applications dans l'étude des xenobiotica 459
Bibliographie (sélective) 499

Addenda 509
Glossaire minimal 515
Index des sujets 527

BCU LAUSANNE UNIVERSITY LIBRARY

CUPRINS

PARTEA I. CONCEPTE ŞI METODE GENERALE 1
1. Biologia moleculară în studiul materiei vii 3
1.1. Consideraţii generale 3
1.2. Diversitatea morfofiziologică a materiei vii 5
1.3. Obiectul de studiu al biologiei moleculare. Interdisciplinaritate 8
1.4. Repere istorice generale 10
1.5. Elemente morfofiziologice şi topobiochimice specifice virusurilor 14
1.5.1. Privire sinoptică 14
1.5.2. Ultrastructura şi topobiochimia virusurilor 15
1.5.2.1. Segmentul capital 17
1.5.2.1.1. Core 19
1.5.2.1.2. Capsida 20
1.5.2.1.3. Peplosul 21
1.5.2.2. Segmentul caudal 22
1.5.2.2.1. Cilindrul axial 22
1.5.2.2.2. Placa bazală 23
1.5.2.2.3. Fibrele caudale 23
1.5.3. Ciclul vital la virusuri 24
1.5.3.1. Ciclul litic 24
1.5.3.2. Ciclul lizogenic 25
1.6. Elemente morfofiziologice şi topobiochimice specifice procariotelor 27
1.6.1. Privire sinoptică 27
1.6.2. Ultrastructura şi topobiochimia celulelor procariotice 29
1.6.2.1. Nucleoidul 31
1.6.2.2. Citoplasma 32
1.6.2.3. Formaţiuni intracelulare 33
1.6.2.3.1. Ribosomi 33
1.6.2.3.2. Mezosomul 34
1.6.2.3.3. Plasmidele 35

BCU IAŞI - UMF UNIVERSITY LIBRARY

1.6.2.3.4. Granule de depozitare 36
1.6.2.3.5. Vacuole 36
1.6.2.3.6. Aparatul fotosintetizant 37
1.6.2.3.7. Alte formaţiuni intracelulare 37
1.6.2.4. Membrana celulară 38
1.6.2.5. Flageli, pili, fimbrine 40
1.6.3. Ciclul celular la procariote 40
1.7. Elemente morfofiziologice şi topobiochimice specifice eucariotelor 41
1.7.1. Privire sinoptică 41
1.7.2. Ultrasructura şi topobiochimia celulelor eucariotice.....42
1.7.2.1. Nucleul 45
1.7.2.2. Citoplasma 46
1.7.2.3. Organite celulare 47
1.7.2.3.1. Mitocondrii 47
1.7.2.3.2. Reticulul endoplasmatic. Ribosomii 49
1.7.2.3.3. Complexul Golgi 52
1.7.2.3.4. Peroxisomi 52
1.7.2.3.5. Glioxisomi 53
1.7.2.3.6. Lizosomi 54
1.7.2.3.7. Centrosomul 55
1.7.2.3.8. Plastide 55
1.7.2.3.9. Vacuole 57
1.7.2.4. Citoscheletul 57
1.7.2.5. Membrana celulară 58
1.7.2.5.1. Caracteristici ultrastructurale ale biomembranelor 59
1.7.2.5.2. Rolul biologic al membranelor 61
1.7.2.6. Bariere membranare ale celulelor 63
1.7.2.6.1. Sisteme de transport – generalităţi 64
1.7.2.6.2. Sisteme de microtransport 65
1.7.2.6.2.1. Transportul transmembranar pasiv 65
1.7.2.6.2.2. Transportul transmembranar activ 73
1.7.2.6.3. Sisteme de macrotransport 75
1.7.2.6.3.1. Endocitoza 75
1.7.2.6.3.2. Exocitoza 77
1.7.2.6.3.3. Specificul sistemelor de macrotransport 77
1.7.2.7. Matricea extracelulară 78

BCU IASI/CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

CUPRINS

1.7.2.7.1. Constituţia matricei extracelulare 79
1.7.2.7.2. Interacţiuea de tip celulă - matrice extracelulară 81
1.7.3. Ciclul celular 82
1.7.4. Tanatocitoza – un concept acreditabil 84
2. Investigarea ultrastructurii şi bioconstituenţilor 89
2.1. Metodologia generală a investigaţiilor 89
2.1.1. Materiale biologice 90
2.1.1.1. Organismul animal intact 90
2.1.1.2. Organéle 91
2.1.1.3. Celulele 92
2.1.1.4. Constituenţi subcelulari 93
2.1.1.5. Virusurile 93
2.1.1.6. Enzimele izolate 93
2.1.2. Procedee de microscopie 94
2.1.2.1. Principii generale 95
2.1.2.2. Caracteristicile procedeelor de microscopie 97
2.1.2.3. Microscopia fotonică 97
2.1.2.3.1. Microscopul fotonic 97
2.1.2.3.2. Tehnici specifice 99
2.1.2.4. Microscopia electronică 101
2.1.2.4.1. Microscopul electronic 102
2.1.2.4.2. Tehnici specifice 103
2.1.2.5. Procedee microscopice în studiul acizilor nucleici din celule 106
2.1.2.5.1. Procedee specifice citochimiei clasice 107
2.1.2.5.2. Procedee specifice biologiei moleculare 108
2.1.2.5.3. Procedee specifice morfologiei şi morfopatologiei 109
2.1.3. Metode biochimice 110
2.1.3.1. Metode analitice metabolice 113
2.1.3.2. Metoda mutanţilor auxotrofi 113
2.1.3.3. Metode izotopice 114
2.1.3.3.1. Utilizarea izotopilor stabili 115
2.1.3.3.2. Utilizarea izotopilor radioactivi 115
2.1.3.4. Metode cromatografice 118
2.1.3.4.1. Cromatografia pe coloană 118
2.1.3.4.2. Cromatografia pe hârtie 120
2.1.3.5. Metode spectrofotometrice 122

BCU IAŞI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

2.1.3.5.1. Spectrometria de absorbţie 128
2.1.3.5.2. Spectrometria de emisie 133
2.1.3.5.3. Spectrometria cu raze X 135
2.1.3.5.4. Spectrometria de fluorescenţă 139
2.1.3.6. Metode stereochimice 141
2.1.3.7. Metode electroforetice 145
2.1.4. Posibilităţi de investigare integrată 147
2.2. Ultrastructura constituenţilor subcelulari 148
2.2.1. Rolul tehnicilor cito- şi histochimice 148
2.2.2. Fracţionarea constituenţilor celulari 149
2.2.2.1. Principiul centrifugării 150
2.2.2.2. Tipuri de centrifugare 152
2.2.2.2.1. Centrifugarea simplă 152
2.2.2.2.2. Centrifugarea de zonă 154
2.2.2.2.3. Centrifugarea izopicnică 154
2.2.2.3. Implicaţiile fracţionării celulare 155
3. Acizii nucleici: structura chimică - activitate biologică 157
3.1. Consideraţii generale 158
3.2. Componente structurale 160
3.2.1. Pentoze 160
3.2.2. Nucleobaze 161
3.2.2.1. Nucleobaze pirimidinice 162
3.2.2.2. Nucleobaze purinice 163
3.2.2.3. Nucleobaze cu incidenţă redusă 164
3.2.2.4. Tautomeria nucleobazelor 166
3.2.3. Acidul fosforic 169
3.3. Precursori structurali 170
3.3.1. Nucleozide 170
3.3.2. Nucleotide 173
3.3.2.1. Mononucleotide 173
3.3.2.2. Derivaţi nucleotidici 176
3.3.2.2.1. Nucleotidpolifosfaţi 176
3.3.2.2.2. Polinucleotide 178
3.4. Acizii nucleici şi nucleoproteidele 179
3.4.1. Particularităţi structurale generale 179
3.4.2. Legături chimice intramoleculare 181
3.5. Acizii deoxiribonucleici 184
3.5.1. Structura chimică 184

3.5.1.1. Structura primară 185
3.5.1.2. Structura secundară 190
3.5.1.3. Structura terţiară 193
3.5.1.4. Structura cuaternară 196
3.5.2. Genuri de acizi deoxiribonucleici 197
3.5.2.1. DNA cu dextrorotaţie 197
3.5.2.1.1. Particularităţi structurale stereochimice 197
3.5.2.1.2. Elemente descriptive privind genurile de DNA 201
3.5.2.2. DNA cu senestrorotaţie 202
3.5.2.3. Forţe intramoleculare specifice pentru DNA 204
3.5.2.4. Dextrorotaţia şi senestrorotaţia la DNA 205
3.5.3. Particularităţi topologice la DNA 206
3.6. Acizii ribonucleici 209
3.6.1. Structura chimică 210
3.6.1.1. Structura primară 210
3.6.1.2. Structura secundară 212
3.6.1.3. Structura terţiară 213
3.6.2. Tipuri de acizi ribonucleici 215
3.6.2.1. RNA mesager 216
3.6.2.2. RNA de transfer 217
3.6.2.3 RNA ribosomal 220
3.6.2.4. RNA nuclear scurt 221
3.6.2.5. Conformaţii macromoleculare la RNA 221
4. Acizii nucleici în biologia moleculară modernă 223
4.1. Consideraţii generale 223
4.2. Gene, acizi nucleici, geniul genetic 225
4.2.1. Cadrul sinoptic 225
4.2.2. Informaţia biologică şi acizii nucleici 229
4.3. Relaţia DNA – filiaţie moleculară 233
4.3.1. Nivele de filiaţie 233
4.3.2. Materia vie şi secvenţele de DNA 234
4.4. Structuri electronice la nucleobaze: particularităţi, importanţă 235
Referinţe bibliografice (selective) 239

PARTEA II. METODE SPECIFICE BIOLOGIEI MOLECULARE 243
5. Genomul şi organizarea genică a materiei vii 245
5.1. Consideraţii generale 245
5.1.1. Genomul la virusuri 248
5.1.2. Genomul la procariote 251

5.1.3. Genomul la eucariote 253
5.2. Interrelaţia genotip – fenotip – mediu 254
5.2.1. Conceptul de genotip 255
5.2.2. Conceptul de fenotip 256
5.2.3. Acţiunea mediului 256
5.2.4. Genele şi programul genetic – coordonate generale 258
5.3. Transmiterea informaţiei genice 259
5.3.1. Privire generală 259
5.3.2. Procesul de replicaţie 260
5.3.3. Procesul de transcripţie 265
5.3.4. Procesul de translaţie 269
5.3.4.1. Specificul translaţiei 269
5.3.4.2. Caracteristicile codului genetic 272
5.3.4.3. Aparatul de translaţie 276
5.3.4.4. Activarea aminoacizilor 278
5.3.4.5. Biosinteza proteinelor – stadii 280
5.3.4.6. Energogeneza şi reglarea biosintezei proteinelor 285
6. Investigarea acizilor nucleici 287
6.1. Consideraţii generale 287
6.2. Metode de dererminare a secvenţelor din molecule de acizi nucleici 289
6.2.1. Privire sinoptică 289
6.2.2. Metoda Maxam-Gilbert 290
6.2.3. Metoda Sanger-Nicklen-Coulsen 292
6.3. Metode de hibridizare a catenelor de acizi nucleici 295
6.3.1. Privire sinoptică 295
6.3.2. Tipuri de hibridizare 295
6.3.3. Disocierea şi asocierea acizilor nucleici 297
6.3.3.1. Reacţia de disociere a acizilor nucleici 298
6.3.3.1.1. Efectul hipercromic 298
6.3.3.1.2. Temperatura de fuziune 299
6.3.3.2. Reacţia de asociere a acizilor nucleici 301
6.3.3.2.1. Asocierea catenelor mc-DNA / mc-DNA 305
6.3.3.2.2. Asocierea catenelor mc-DNA / mc-RNA 306
6.3.4. Metode de investigare a reacţiilor de disociere şi de asociere 309
6.4. Metode de detectarea prin sonde moleculare 310
6.4.1. Privire sinoptică 310
6.4.2. Sonde mole culare radiomarcate 312
6.4.3. Sonde moleculare chimiomarcate 313

6.4.3.1. Sondele moleculare chimiomarcate direct 313
6.4.3.2. Sondele moleculare chimiomarcate indirect 313
6.5. Metode de investigare a fragmentelor moleculare de acizi nucleici 314
6.5.1. Privire sinoptică 314
6.5.2. Metoda Southern 314
6.5.3. Metoda Northern 316
6.6. Metoda amplificării prin reacţia în lanţ a polimerazei (PCR) 317
6.6.1. Privire sinoptică 317
6.6.2. Principii metodologice 318
6.6.2.1. Particularităţile ciclului de amplificare 319
6.6.2.2. Investigarea DNA cu metoda amplificării prin PCR 322
6.6.3. Aplicaţii ale metodei de amplificare prin PCR 323
6.6.3.1. Aplicaţii în diagnostic 323
6.6.3.1.1. Aplicaţii în eredopatologie 323
6.6.3.1.2. Aplicaţii în oncologie 324
6.6.3.1.3. Aplicaţii în detectarea infecţiilor 324
6.6.3.2. Aplicaţii în medicina legală 325
6.6.3.3. Aplicaţii în ginecologie 326
6.6.3.4. Aplicaţii în cartarea genomului 326
6.7. Metoda evaluarii polimorfismului lungimii fragmentului de restricţie (RFLP) 327
6.7.1. Privire sinoptică 327
6.7.2. Principii metodologice 328
6.7.3. Aplicaţii ale metodei de evaluare a RFLP 330
6.7.3.1. Genetica inversă 331
6.7.3.2. Amprenta DNA 334
6.8. Recombinarea genică – sinoptic 335
6.8.1. Transferul genelor cu ajutorul plasmidelor 336
6.8.1.1. Procedeul de utilizare a DNA genomic 337
6.8.1.2. Procedeul de utilizare a RNA mesager 338
6.8.2. Transferul genelor cu ajutorul virusurilor 339
7. Recombinarea genică naturală 341
7.1. Consideraţii generale 341
7.2. Recombinarea genică la virusuri 342
7.3. Recombinarea genică la procariote 344
7.3.1. Transformarea 345
7.3.2. Conjugarea 348
7.3.3. Sexducţia 350

7.3.4. Transducţia 351
7.4. Recombinarea genică la eucariote 354
8. Recombinarea genică mediată biotehnologic 357
8.1. Consideraţii generale 357
8.2. Mijloace operatoare pentru DNA recombinant 358
8.2.1. Enzime de restricţie şi modificaţie 358
8.2.1.1. Enzime de restricţie 361
8.2.1.2. Enzime de modificaţie 364
8.2.2. Enzime din grupa DNA polimerazelor 365
8.2.2.1. DNA polimeraze – DNA dependente 365
8.2.2.2. DNA polimeraze – RNA dependente 367
8.2.3. Enzime din grupa DNA ligazelor 368
8.3. Strategia obţinerii DNA recombinant 369
8.3.1. Principii generale 369
8.3.2. Conceptul de vector 370
8.3.2.1. Plasmidele 371
8.3.2.2. Bacteriofagii 373
8.3.2.3. Cosmidele 375
8.3.3. Conceptul de pasager 376
8.3.4. Formarea moleculelor de DNA recombinant 377
8.3.5. Clonarea DNA recombinant 380
Referinţe bibliografice (selective) 383

PARTEA III. APLICAŢII ALE BIOLOGIEI MOLECULARE 389
9. Aplicaţii în biotehnologie 391
9.1. Consideraţii generale 391
9.2. Specificul domeniilor aplicative 391
9.3. Aplicaţii de interes farmaceutic 392
9.3.1. Somatostatina 393
9.3.2. Insulina 394
9.3.3. Hormonul somatotrop 396
9.4. Aplicaţii de interes alimentar 397
9.4.1. Enzime cu atribute de aditivi alimentari 397
9.4.1.1. Enzimele în biochimia generală 398
9.4.1.2. Enzimele în biotehnologia alimentară 403
9.4.2. Obţinerea de aditivi microbiologici enzimatici 405
9.4.3. Obţinerea de aditivi biochimici enzimatici 406
9.4.4. Obţinerea de preparate enzimatice prin metode specifice

biologiei moleculare 407
9.4.5. Investigaţii asupra unor sisteme enzimatice in situ 409
9.5. Aplicaţii cu referire la animale 411
9.6. Aplicaţii cu referire la plante 414
9.7. Aplicaţii de interes agrobiologic 418
9.7.1. Privire sinoptică 418
9.7.2. Transgeneza: de la concept la aplicaţii 419
9.7.2.1. Metode de transfer a genelor 419
9.7.2.2. Etapele transgenezei 420
9.7.3. Aplicaţii privind organismele modificate genetic în agricultură ...421
9.7.4. Aplicaţii privind organismele modificate genetic în zoocultură ...422
9.7.5. Transgenicitatea şi ambientul 423
9.8. Biotehnologiile – cadru sinoptic 426
9.8.1. Aspecte interdisciplinare 426
9.8.2. Interconexiuni ale biotehnologiilor 427
9.8.2.1. Procese biologice 427
9.8.2.2. Echipamente tehnologice 428
9.8.2.3. Procedee industriale 428
10. Aplicaţii cu specific biomedical 429
10.1. Consideraţii generale 429
10.2. Explorarea nivelelor de filiaţie 429
10.3. Diagnosticul prenatal 430
10.4. Obţinerea de mediatori chimici pentru răspunsul imun 431
10.4.1. Interferonii 431
10.4.2. Interleukinele 434
10.5. Obţinerea vaccinurilor 436
10.6. Investigaţii în medicina legală 437
10.7. Cartarea genomului uman 438
11. Aplicaţii de interes cronobiochimic 441
11.1. Consideraţii generale 441
11.2. Bioritmurile şi biologia moleculară 443
11.2.1. Periodicitatea bioritmurilor 443
11.2.2. Condiţionarea bioritmurilor 444
11.3. Principalele tipuri de bioritmuri 445
11.3.1. Bioritmurile ultradiene 445
11.3.2. Bioritmurile circadiene 445
11.3.3. Bioritmurile infradiene 448
11.4. Parametri cronbiochimici specifici ritmurilor biologice 450

BCU BUCUREŞTI UNIVERSITY LIBRARY

11.5. Autonomia şi sincronizarea bioritmurilor 451
11.5.1. Autonomia bioritmurilor 452
11.5.2. Sincronizarea bioritmurilor 453
11.6. Implicaţii ale biologiei moleculare şi cronobiochimiei în senescenţă 455
12. Aplicaţii în studiul xenobioticelor 459
12.1. Consideraţii generale 459
12.2. Xenobiotice de interes nutriţional 461
12.2.1. Aditivi alimentari 462
12.2.2. Poluanţi chimici alimentari 467
12.3. Xenobiotice de interes farmaceutic 470
12.3.1. Medicamente chimioterapice 470
12.3.2. Chimioterapice citostatice 471
12.4. Xenobiotice de interes nutriţional şi carcinogeneza chimică 472
12.4.1. Privire sinoptică 472
12.4.2. Acidul deoxiribonucleic în carcinogeneza chimică 473
12.4.3. Interacţia unor compuşi organici policiclici şi a unor ioni metalici cu DNA 475
12.4.4. Aducţi DNA cu compuşi organici policiclici şi cu ioni metalici 482
12.5. Xenobioticele de interes farmaceutic utilizate în chimioterapia citostatică 488
12.5.1. Privire sinoptică 488
12.5.2. Acidul deoxiribonucleic în chimioterapia citostatică 489
12.5.3. Interacţia unor chimioterapice citostatice cu DNA 492
12.5.4. Complecşi DNA-citostatice 493
Referinţe bibliografice (selective) 499

Addenda 509
Glosar minimal 515
Index de subiecte 527

BCU IASI/CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

CONTENTS

PART I. CONCEPTS AND METHODS 1
1. Molecular biology in the study of the living matter 3
1.1. General considerations 3
1.2. Morphophysiologic diversity of living matter 5
1.3. Object of molecular biology. Interdisciplinarity 8
1.4. Historical references 10
1.5. Specific morphophysiological and topobiochemical elements of viruses 14
1.5.1. Synoptic view 14
1.5.2. Ultrastructure and topobiochemistry of viruses 15
1.5.2.1. Head 17
1.5.2.1.1. Core 19
1.5.2.1.2. Capsid 20
1.5.2.1.3. Peplos 21
1.5.2.2. Tail 22
1.5.2.2.1. Axial cylinder 22
1.5.2.2.1. Terminal plate 23
1.5.2.2.2. Terminal fibers 23
1.5.3. Vital cycle of viruses 24
1.5.3.1. Lytic cycle 24
1.5.3.2. Lysogenic cycle 25
1.6. Specific morphophysiological and topobiochemical elements of prokaryotes 27
1.6.1. Synoptic view 27
1.6.2. Ultrastructure and topobiochemistry of prokaryotic cells 29
1.6.2.1. Nucleoid 31
1.6.2.2. Cytoplasm 32
1.6.2.3. Intracellular elements 33
1.6.2.3.1. Ribosomes 33
1.6.2.3.2. Mesosomes 34

BCU LIBRARY

1.6.2.2.3. Plasmids 35
1.6.2.2.4. Storage droplets 36
1.6.2.2.5. Vacuoles 36
1.6.2.2.6. Photosynthetisant apparatus....37
1.6.2.2.7. Other intracellular microbodies....37
1.6.2.4. Cell membrane 38
1.6.2.5. Flagella, pili, fimbriae 40
1.6.3. Cellular cycle in prokaryotes....40
1.7. Specific morphophysiological and topobiochemical elements of eukaryotes 41
1.7.1. Synoptic view....41
1.7.2. Ultrastructure and topobiochemistry of eukaryotic cells....42
1.7.2.1. Cell nucleus 45
1.7.2.2. Cytoplasm 46
1.7.2.3. Cell organelles 47
1.7.2.3.1. Mitochondria 47
1.7.2.3.2. Endoplasmic reticulum. Ribosomes 49
1.7.2.3.3. Golgi complex 52
1.7.2.3.4. Peroxisomes 52
1.7.2.3.5. Glyoxisomes....53
1.7.2.3.6. Lysosomes 54
1.7.2.3.7. Centrosome....55
1.7.2.3.8. Plastides 55
1.7.2.3.9. Vacuoles 57
1.7.2.4. Cytoskeleton 57
1.7.2.5. Cell membrane 58
1.7.2.5.1. Ultrastructural characteristics of membranes 59
1.7.2.5.2. Biologic role of membranes....61
1.7.2.6. Membrane barriers of cells 63
1.7.2.6.1. Transport systems – generalities....64
1.7.2.6.2. Microtransport systems....65
1.7.2.6.2.1. Passive transmembrane transport....65
1.7.2.6.2.2. Active transmembrane transport....73
1.7.2.6.3. Macrotransport systems....75
1.7.2.6.3.1. Endocytosis 75
1.7.2.6.3.2. Exocytosis 77
1.7.2.6.3.3. Specificity of macrotransport systems 77

BCU IAŞI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

1.7.2.7. Extracellular matrix 78
1.7.2.7.1. Constitution of extracellular matrix 79
1.7.2.7.2. Interaction cell-extracellular matrix 81
1.7.3. Cell cycle 82
1.7.4. Tanatocytosis – a believable concept 84
2. Investigation of ultrastructure and bioconstituents 89
2.1. General methodology of investigations 89
2.1.1. Biological materials 90
2.1.1.1. Unimpaired animal organism 90
2.1.1.2. Organelles 91
2.1.1.3. Cells 92
2.1.1.4. Subcellular constituents 93
2.1.1.5. Viruses 93
2.1.1.6. Isolated enzymes 93
2.1.2. Microscopical procedures 94
2.1.2.1. General principles 95
2.1.2.2. Characteristics of microscopical procedures 97
2.1.2.3. Light microscopy 97
2.1.2.3.1. Light microscope 97
2.1.2.3.2. Specific techniques 99
2.1.2.4. Electron microscopy 101
2.1.2.4.1. Electron microscope 102
2.1.2.4.2. Specific techniques 103
2.1.2.5. Microscopic procedures in the study of nucleic acids of cells 106
2.1.2.5.1. Specific procedures of classic citochemistry 107
2.1.2.5.2. Specific procedures of molecular biology 108
2.1.2.5.3. Specific procedures of morphology and morphopathology 109
2.1.3. Biochemical methods 110
2.1.3.1. Metabolic analytical methods 113
2.1.3.2. Method of auxotrophe mutants 113
2.1.3.3. Isotopic methods 114
2.1.3.3.1. Use of stable isotopes 115
2.1.3.3.2. Use of radioactive isotopes 115
2.1.3.4. Chromatographic methods 118
2.1.3.4.1. Column chromatography 118
2.1.3.4.2. Paper chromatography 120

BCU IAȘI - CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

2.1.3.5. Spectrophotometric methods 122
2.1.3.5.1. Absorption spectrometry 128
2.1.3.5.2. Emission spectrometry 133
2.1.3.5.3. X-ray spectrometry 135
2.1.3.5.4. Fluorescence spectrometry 139
2.1.3.6. Stereochemical methods 141
2.1.3.7. Electrophoretical methods 145
2.1.4. Possibilities of integrated investigation 147
2.2. Ultrastructure of subcellular constituents 148
2.2.1. The role of cyto- and histochemical techniques 148
2.2.2. Fractionating of cell constituents 149
2.2.2.1. Principle of centrifugation 150
2.2.2.2. Types of centrifugation 152
2.2.2.2.1. Simple centrifugation 152
2.2.2.2.2. Zone centrifugation 154
2.2.2.2.3. Isopicnic centrifugation 154
2.2.2.3. Implications of cell fractionating 155
3. Nucleic acids: chemical structure and biological activity 157
3.1. General considerations 158
3.2. Structural components 160
3.2.1. Pentoses 160
3.2.2. Nucleobases 161
3.2.2.1. Pyrimidine nucleobases 162
3.2.2.2. Purine nucleobases 163
3.2.2.3. Nucleobases with reduced incidence 164
3.2.2.4. Tautomeria of nucleobases 166
3.2.3. Phosphoric acid 169
3.3. Structural precursors 170
3.3.1. Nucleosides 170
3.3.2. Nucleotides 173
3.3.2.1. Mononucleotides 173
3.3.2.2. Nucleotidic derivatives 176
3.3.2.2.1. Nucleoside polyphosphates 176
3.3.2.2.2. Polynucleotides 178
3.4. Nucleic acids and nucleoprotids 179
3.4.1. General structural peculiarities 179
3.4.2. Intramolecular chemical bonds 181
3.5. Deoxyribonucleic acids 184

BCU IAŞI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

3.5.1. Chemical structure 184
3.5.1.1. Primary structure 185
3.5.1.2. Secondary structure 190
3.5.1.3. Tertiary structure 193
3.5.1.4. Quaternary structure 196
3.5.2. DNA families 197
3.5.2.1. DNA with dextrorotation 197
3.5.2.1.1. Stereochemical structural particularities 197
3.5.2.1.2. Descriptive elements of DNA families 201
3.5.2.2. DNA with senestrorotation 202
3.5.2.3. Intramolecular forces specific for DNA 204
3.5.2.4. Dextrorotation and senestrorotation at DNA 205
3.5.3. Topological peculiarities of DNA 206
3.6. Ribonucleic acids 209
3.6.1. Chemical structure 210
3.6.1.1. Primary structure 210
3.6.1.2. Secondary structure 212
3.6.1.3. Tertiary structure 213
3.6.2. RNA types 215
3.6.2.1. Messenger RNA 216
3.6.2.2. Transfer RNA 217
3.6.2.3. Ribosomal RNA 220
3.6.2.4. Nuclear short RNA 221
3.6.2.5. Macromolecular configurations in RNA 221
4. Nucleic acids in modern molecular biology 223
4.1. General considerations 223
4.2. Genes, nucleic acids, genetic genius 225
4.2.1. Synoptic frame 225
4.2.2. Biological information and nucleic acids 229
4.3. Relationship DNA-molecular filiation 233
4.3.1. Filiation levels 233
4.3.2. Living matter and DNA sequences 234
4.4. Electronic structures in nucleobases: peculiarities, importance 235
Bibliographical references (selective) 239

PART II. SPECIFIC MEHODS IN MOLECULAR BIOLOGY 243
5. Genome and genic organisation of living matter 245
5.1. General considerations 245
5.1.1. Genome in viruses 248

5.1.2. Genome in prokaryotes....251
5.1.3. Genome in eukaryotes....253
5.2. Genotype-phenotype-environment interaction....254
5.2.1. Concept of genotype....255
5.2.2. Concept of phenotype....256
5.2.3. The action of the environment....256
5.2.4. Genes and the genetic program - general coordinatives....258
5.3. Transmission of genetic information....259
5.3.1. Synoptic view....259
5.3.2. Process of replication....260
5.3.3. Process of transcription....265
5.3.4. Process of translation....269
5.3.4.1. Specificity of translation....269
5.3.4.2. Characteristics of the genetic code....272
5.3.4.3. Translation apparatus....276
5.3.4.4. Activation of amino acids....278
5.3.4.5. Biosynthesis of proteins – steps....280
5.3.4.6. Energogenesis and the regulation of protein biosynthesis....285
6. Investigation of nucleic acids....287
6.1. General considerations....287
6.2. Methods for determination the sequences of nucleic acids....289
6.2.1. Synoptic view....289
6.2.2. Maxam-Gilbert method....290
6.2.3. Sanger-Nicklen-Coulsen method....292
6.3. Methods of hybridisation of nucleic acids chains....295
6.3.1. Synoptic view....295
6.3.2. Types of hybridisation....295
6.3.3. Dissociation and association of nucleic acids....297
6.3.3.1. Dissociation of nucleic acids....298
6.3.3.1.1. Hyperchromic effect....298
6.3.3.1.2. Melting temperature....299
6.3.3.2. Association of nucleic acids....301
6.3.3.2.1. Association of mc-DNA / mc-DNA chains....305
6.3.3.2.2. Association of mc-DNA / mc-RNA chains....306
6.3.4. Methods for investigating the dissociation and association reactions.309
6.4. Methods of detection by molecular sondes....310
6.4.1. Synoptic view....310
6.4.2. Radiomarked molecular sondes....312

BCU IAŞI CENTRALA UNIVERSITY LIBRARY

6.4.3. Chemiomarked molecular sondes 313
6.4.3.1. Directly marked molecular sondes 313
6.4.3.2. Indirectly marked molecular sondes 313
6.5. Methods of investigation the molecular fragment of nucleic acids 314
6.5.1. Synoptic view 314
6.5.2. Southern method 314
6.5.3. Northern method 316
6.6. Method of amplification by polymerase chain reaction (PCR) 317
6.6.1. Synoptic view 317
6.6.2. Methodological principles 318
6.6.2.1. Particularities of the amplification cycle 319
6.6.2.2. DNA investigation by the PCR amplification method 322
6.6.3. Applications of the PCR amplification method 323
6.6.3.1. Applications in diagnose 323
6.6.3.1.1. Applications in eredopathology 323
6.6.3.1.2. Applications in oncology 324
6.6.3.1.3. Applications in the detection of infections 324
6.6.3.2. Applications in forensic medicine 325
6.6.3.3. Applications in gynecology 326
6.6.3.4. Applications in genome mapping 326
6.7. Method of evaluation of the restriction fragment length polymorphism (RFLP) 327
6.7.1. Synoptic view 327
6.7.2. Methodological principles 328
6.7.3. Applications of the methods of evaluation of RFLP 330
6.7.3.1. Reverse genetics 331
6.7.3.2. DNA fingerprint 334
6.8. Genic recombination – synoptic 335
6.8.1. Gene transfer by plasmides 336
6.8.1.1. Use of genomic DNA 337
6.8.1.2. Use of messenger RNA 338
6.8.2. Gene transfer by viruses 339
7. Natural genic recombination 341
7.1. General considerations 341
7.2. Genic recombination in viruses 342
7.3. Genic recombination in prokaryotes 344
7.3.1. Transformation 345
7.3.2. Conjugation 348

7.3.3. Sexduction 350
7.3.4. Transduction 351
7.4. Genic recombination in eukaryotes 354
8. Biotechnologically mediated genic recombination 357
8.1. General considerations 357
8.2. Operating means for recombinant DNA 358
8.2.1. Restriction and modification enzymes 358
8.2.1.1. Restriction enzymes 361
8.2.1.2. Modification enzymes 364
8.2.2. Enzymes of DNA polymerases group 365
8.2.2.1. DNA-polymerases - DNA dependent 365
8.2.2.2. DNA polymerases - RNA dependent 367
8.2.3. Enzymes of the DNA ligases group 368
8.3. Strategies for the obtainment of recombinant DNA 369
8.3.1. General principles 369
8.3.2. Concept of vector 370
8.3.2.1. Plasmides 371
8.3.2.2. Bacteriophage 373
8.3.2.3. Cosmides 375
8.3.3. Concept of passenger 376
8.3.4. Recombinant DNA molecules formation 377
8.3.5. Cloning of recombinant DNA 380
Bibliographical references (selective) 383

PART III. APPLICATIONS OF MOLECULAR BIOLOGY 389
9. Biotechnological applications 391
9.1. General considerations 391
9.2. Specificity of applicative domains 391
9.3. Applications of pharmaceutical interest 392
9.3.1. Somatostatine 393
9.3.2. Insulin 394
9.3.3. Somatotrope hormone 396
9.4. Application of nutritional interest 397
9.4.1. Enzymes with atributes of food additives 397
9.4.1.1. Enzymes in general biochemistry 398
9.4.1.2. Enzymes in food biotechnology 403
9.4.2. Obtainment of enzymatic microbiologic additives 405
9.4.3.Obtainment of enzymatic biochemical additives 406

9.4.4. Obtainment of enzymatic compounds by methods specific for molecular biology 407
9.4.5. Investigations on enzymatic systems in situ....409
9.5. Applications referring to animals 411
9.6. Applications referring to plants....414
9.7. Applications of agrobiological interest 418
9.7.1. Synoptic view 418
9.7.2. Transgenesis: from concepts to applications 419
9.7.2.1. Methodes for genes transfer 419
9.7.2.2. Phases of transgenesis 420
9.7.3. Applications concerning the genetically modified organisms in agriculture 421
9.7.4. Applications concerning the genetically modified organisms in zootechny 422
9.7.5. Transgenicity and environment 423
9.8. Biotechnologies – synoptic frame 426
9.8.1. Interdisciplinary aspects 426
9.8.2. Interconnections of biotechnologies....427
9.8.2.1. Biological processes....427
9.8.2.2. Technological equipments 428
9.8.2.3. Industrial processing 428
10. Biomedical applications 429
10.1. General considerations....429
10.2. Exploration of filiation levels 429
10.3. Prenatal diagnosis 430
10.4. Obtainment of chemical mediators for the immune response....431
10.4.1. Interferons....431
10.4.2. Interleukines 434
10.5. Obtainment of vaccines....436
10.6. Investigations in forensic medicine....437
10.7. Mapping of human genome 438
11. Chronobiochemical applications....441
11.1. General considerations....441
11.2. Biorhythms and molecular biology 443
11.2.1. Periodicity of biorhythms 443
11.2.2. Conditioning of biorhythms....444
11.3. Main types of biorhythms 445
11.3.1. Ultradiene biorhythms. 445

11.3.2. Circadian biorhythms. 445
11.3.3. Infradiene biorhythms....448
11.4. Chronobiochemical parameters specific for biologic rhythms 450
11.5. Autonomy and synchronisation of biorhythms 451
11.5.1. Autonomy of biorhythms....452
11.5.2. Synchronisation of biorhythms....453
11.6. Implications of molecular biology and chronobiochemistry in aging....455
12. Applications in the study of xenobiotics....459
12.1. General considerations....459
12.2. Xenobiotics of nutritional interest 461
12.2.1. Food additives 462
12.2.2. Chemical food pollutants....467
12.3. Xenobiotics of pharmaceutical interest 470
12.3.1. Chemiotherapic drugs....470
12.3.2. Cytostatic chemiotherapics....471
12.4. Xenobiotics with nutritional interest and chemical carcinogenesis 472
12.4.1. Synoptic view 472
12.4.2. Deoxyribonucleic acid in chemical carcinogenesis 473
12.4.3. Interaction of some polycyclic organic compounds and some metal ions with DNA 475
12.4.4. DNA adducts with polycyclic organic compounds and metal ions....482
12.5 Xenobiotics of pharmaceutical interest used in cytostatic chemotherapy 488
12.5.1. Synoptic view....488
12.5.2. Deoxyribonucleic acid in cytostatic chemotherapy....489
12.5.3. Interaction of some chemotherapics with DNA....492
12.5.4. Complexes DNA-cytostatics....493
Bibliographical references (selective)....499

Addenda 509
Minimal glossary....515
Subject index....527

BCU IAŞI / OANA RALEA UNIVERSITY LIBRARY

INHALT

TEIL I. KONZEPTE UND METHODEN 1
1. Molekularbiologie zum Studie des lebendigen Stoffes 3
1.1. Allgemeines 3
1.2. Morphophysiologische Verschiedenheit des lebendigen Stoffes 5
1.3. Themen der Molekularbiologie. Interdisziplinarität 8
1.4. Historische Daten. 10
1.5. Morpho-funktionelle und topobiochemische Elemente der Viren 14
1.5.1. Synoptisches Ubersicht 14
1.5.2. Die Ultrastruktur und Topobiochemie der Viren 15
1.5.2.1. Kopf 17
1.5.2.1.1. Core 19
1.5.2.1.2. Kapside 20
1.5.2.1.2. Peplos 21
1.5.2.2. Schwanz 22
1.5.2.2.1. Axial Zylinder 22
1.5.2.2.2. Basalplatte 23
1.5.2.2.3. Schwanzfasern 23
1.5.3.Lebenszyklus der Viren 24
1.5.3.1. Lytischer Zyklus 24
1.5.3.2. Lysogener Zyklus 25
1.6. Morpho-funktionelle und topobiochemische Elemente der Prokaryonten 27
1.6.1. Synoptisches Ubersicht 27
1.6.2. Ultrastruktur und Topobiochemie der prokaryontischen Zellen 29
1.6.2.1. Zellkern 31
1.6.2.2. Zytoplasma 32
1.6.2.3. Intrazelluläre Formationen 33
1.6.2.3.1. Ribosomen 33
1.6.2.3.2. Mesosome 34

BCU CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

1.6.2.3.3. Plasmiden 35
1.6.2.3.4. Lagerungsgranula 36
1.6.2.3.5. Vakuolen 36
1.6.2.3.6. Photosynthetisant Apparat 37
1.6.2.3.7. Andere intrazelluläre Formationen 37
1.6.2.4. Zellmembran 38
1.6.2.5. Flagelle, Pili, Fimbrine 40
1.6.3. Zellzyklus in Prokaryonten 40
1.7. Morpho-funktionelle und topobiochemische Elemente der Eukaryonten 41
1.7.1. Synoptisches Ubersicht 41
1.7.2. Ultrastruktur und Topobiochemie der eukaryontischen Zellen 42
1.7.2.1. Zellkern 45
1.7.2.2. Zytoplasma 46
1.7.2.3. Zellorganelle 47
1.7.2.3.1. Mitochondrien 47
1.7.2.3.2. Endoplamatisches Retikulum. Ribosomen 49
1.7.2.3.3. Golgi Komplex 52
1.7.2.3.4. Peroxisomen 52
1.7.2.3.5. Glyoxisomen 53
1.7.2.3.6. Lysosomen 53
1.7.2.3.7. Zentrosom 55
1.7.2.3.8. Plastide 55
1.7.2.3.9. Vakuolen 57
1.7.2.4. Cytoskelette 57
1.7.2.5. Zellmembran 58
1.7.2.5.1. Ultrastrukturale Charakteristika der Biomembranen 59
1.7.2.5.2. Biologische Role der Membranen 61
1.7.2.6. Membranbarriere der Zellen 63
1.7.2.6.1. Transportsysteme – allgemeines 64
1.7.2.6.2. Mikrotransportsysteme 65
1.7.2.6.2.1. Pasives transmembranär Transport 65
1.7.2.6.2.2. Aktives transmembranär Transport 73
1.7.2.6.3. Makrotransportsysteme 75
1.7.2.6.3.1. Endocytosis 75
1.7.2.6.3.2. Exocytosis 77
1.7.2.6.3.3. Spezifizität der Makrotransport-systeme 77

BCU IASI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

1.7.2.7. Extrazelluläre Matrix 78
1.7.2.7.1. Konstitution der extrazellulären Matrix 79
1.7.2.7.2. Interaktion Zelle-extrazelluläre Matrix 81
1.7.3. Zellzyklus 82
1.7.4. Tanatocytosis – ein beglaubiges Konzept 84
2. Nachforschung über die Ultrastruktur und die Biokonstituenten 89
2.1. Allgemeine Grundbegriffe 89
2.1.1. Biologische Stoffe 90
2.1.1.1. Tierisches Organismus 90
2.1.1.2. Organellen 91
2.1.1.3. Zellen 92
2.1.1.4. Subzelluläre Konstituenten 93
2.1.1.5. Viren 93
2.1.1.6. Isolierte Enzymen 93
2.1.2. Mikroskopische Methoden 94
2.1.2.1. Grundbegriffe 95
2.1.2.2. Charakteristika der mikroskopischen Methoden 97
2.1.2.3. Photonen Mikroskopie 97
2.1.2.3.1. Photonischesmikroskop 97
2.1.2.3.2. Spezifische Technik 99
2.1.2.4. Elektronen Mikroskopie 101
2.1.2.4.1. Elektronenmikroskop 102
2.1.2.4.2. Spezifische Technik 103
2.1.2.5. Mikroskopische Methoden zum Studie der Nukleinsäuren in den Zellen 106
2.1.2.5.1. Spezifische Methoden für die klasische Cytochemie 107
2.1.2.5.2. Spezifische Methoden der Molekularbiologie 108
2.1.2.5.3. Spezifische Methoden für Morphologie und Morphopathologie 109
2.1.3. Biochemische Methoden 110
2.1.3.1. Analytisch-metabolische Methoden 113
2.1.3.2. Metode der auxotrophischen Mutanten 113
2.1.3.3. Isotopenmethoden 114
2.1.3.3.1. Benützung der stabilen Isotopen 115
2.1.3.3.2. Benützung der radioaktiven Isotopen 115
2.1.3.4. Cromatographische Methoden 118
2.1.3.4.1. Säulenchromatographie 118
2.1.3.4.2. Papierchromatographie 120

BCU IAȘI CLUJ UNIVERSITY LIBRARY

2.1.3.5. Spektrophotometrische Methoden 122
2.1.3.5.1. Absorptionspektrometrie 128
2.1.3.5.2. Emisionspektrometrie 133
2.1.3.5.3. X - Strahlung Spektrometrie 135
2.1.3.5.4. Fluoreszenz Spektrometrie 139
2.1.3.6. Stereochemische Methoden 141
2.1.3.7. Elektrophoretische Methoden 145
2.1.4. Integrierte Analysenmöglichkeiten 147
2.2. Ultrastruktur der subzellulären Konstituenten 148
2.2.1. Role der cyto- und hystochemischen Techniken 148
2.2.2. Fraktionierung der Zellkonstituenten 149
2.2.2.1. Grundbegriff der Zentrifugation 150
2.2.2.2. Typen von Zentrifugation 152
2.2.2.2.1. Einfache Zentrifugation 152
2.2.2.2.2. Zonen Zentrifugation 154
2.2.2.2.3. Isopiknische Zentrifugation 154
2.2.2.3. Folgen der Zellteilung 155
3. Nukleinsäuren: chemische Struktur - biologische Aktivität 157
3.1. Allgemeines 158
3.2. Strukturkomponente 160
3.2.1. Pentosen 160
3.2.2. Nukleobasen 161
3.2.2.1. Pyrimidinische Nukleobasen 162
3.2.2.2. Purinische Nukleobasen 163
3.2.2.3. Seltene Nukleobasen 164
3.2.2.4. Tautomerie der Nukleobasen 166
3.2.3. Phosphorsäure 169
3.3. Strukturale Vorgänger 170
3.3.1. Nukleosiden 170
3.3.2. Nukleotiden 173
3.3.2.1. Mononukleotiden 173
3.3.2.2. Nukleotidderivate 176
3.3.2.2.1. Nukleosidpoliphosphaten 176
3.3.2.2.2. Polinukleotiden 178
3.4. Desoxyribonukleinsäuren und Nukleoproteiden 179
3.4.1. Allgemeines 179
3.4.2. Intramolekuläre chemische Bindungen 181
3.5. Desoxyribonukleinsäuren 184

3.5.1. Chemische Struktur 184
3.5.1.1. Primärstruktur 185
3.5.1.2. Sekundärstruktur 190
3.5.1.3. Tertiärstruktur 193
3.5.1.4. Quartärstruktur 196
3.5.2. Desoxyribonukleinsäuren Typen 197
3.5.2.1. DNS mit rechts Rotation 197
3.5.2.1.1. Stereochemische Struktur - Eingenschaften ... 197
3.5.2.1.2. Deskriptivelemente der DNS Typen 201
3.5.2.2. DNS mit links Rotation 202
3.5.2.3. Intramolekuläre Kräfte in DNS 204
3.5.2.4. Rechts- und linksrotation in DNS 205
3.5.3. Topologische Eigenschaften der DNS 206
3.6. Ribonukleinsäuren 209
3.6.1. Chemische Struktur 210
3.6.1.1. Primärstruktur 210
3.6.1.2. Sekundärstruktur 212
3.6.1.3. Tertiärstruktur 213
3.6.2. Ribonukleinsäuren Typen 215
3.6.2.1. Boten RNS 216
3.6.2.2. Transfer RNS 217
3.6.2.3. Ribosomale RNS 220
3.6.2.4. Kurz nuklear RNS 221
3.6.2.5. Makromolekular Gestaltungen in RNS 221
4. Nukleisäuren in die moderne Molekularbiologie 223
4.1. Allgemeines 223
4.2. Gene, Nukleinsäuren, genetisches Genie 225
4.2.1. Synoptische Rahmen 225
4.2.2. Biologische Information und die Nukleinsäuren 229
4.3. Beziehung DNS – Molekularfiliation 233
4.3.1. Filiationsniveaus 233
4.3.2. Lebendiges Stoff und DNS Sequenzen 234
4.4. Elektronische Strukturen in Nukleobasen: Eigenschaften, Wichtigkeit . 235
Bibliographie (selektiv) 239

TEIL II. SPEZIFISCHE METHODEN DER MOLEKULARBIOLOGIE ..243
5. Genom und genische Organisierung des lebendigen Stoffes 245
5.1. Allgemeines 245
5.1.1. Genom in Viren 248

5.1.2. Genom in Prokaryonten 251
5.1.3. Genom in Eukaryonten 253
5.2. Genotyp-Phänotyp-Milieu Zusammenhang 254
5.2.1. Konzept von Genotyp 255
5.2.2. Konzept von Phänotyp 256
5.2.3. Aktion des Milieus 256
5.2.4. Genen und das genetische Program – Allgemeines 258
5.3. Ubertragung der Geninformation 259
5.3.1. Synoptisches Uberblick 259
5.3.2. Replikationprozess 260
5.3.3. Transkriptionprozess 265
5.3.4. Translationprozess 269
5.3.4.1. Spezifikum der Translation 269
5.3.4.2. Eigenschaften des genetischen Kode 272
5.3.4.3. Translationsapparat 276
5.3.4.4. Aktivierung der Aminosäuren 278
5.3.4.5. Biosynthese der Proteinen – Etappen 280
5.3.4.6. Energogenesis und Regulation der Proteinbiosynthesis ... 285
6. Nachforschung der Nukleinsäuren 287
6.1. Allgemeines 287
6.2. Methoden zur Bestimmung der Sequenzen aus der Nukleinsäurenmoleküle 289
6.2.1. Synoptisches Uberblick 289
6.2.2. Maxam-Gilbert Methode 290
6.2.3. Sanger-Nicklen-Coulsen Methode 292
6.3. Hybridisierungmethoden der Nukleisäurenketten 295
6.3.1. Synoptische Uberblick 295
6.3.2. Hybridisierung Typen 295
6.3.3. Assoziation und Dissoziation der Nukleinsäuren 297
6.3.3.1. Dissoziation der Nukleinsäuren 298
6.3.3.1.1. Hyperchromisches Effect 298
6.3.3.1.2. Fusiontemperatur 299
6.3.3.2. Assoziation der Nukleinsäuren 301
6.3.3.2.1. Assoziation der mc-DNS / mc-DNS Ketten ... 305
6.3.3.2.2. Assoziation der mc-DNS / mc-RNS Ketten 306
6.3.4. Nachforschungmethoden für die assoziation-dissoziation Reaktien 309
6.4. Detektionmethoden durch Molekularsonden 310
6.4.1. Synoptisches Uberblick 310
6.4.2. Radiomarkierte Molekularsonden 312

6.4.3. Chemiomarkierte Molekularsonden 313
6.4.3.1. Direkt chemiomarkierte Molekularsonden 313
6.4.3.2. Indirekt chemiomarkierte Molekularsonden 313
6.5. Untersuchungsmethoden für die Molekularfragmente der Nukleinsäuren 314
6.5.1. Synoptisches Uberblick 314
6.5.2. Southern Methode 314
6.5.3. Northern Methode 316
6.6. Kettenreaktion der Polymerase (Polymerase Chain Reaction - PCR) 317
6.6.1. Synoptisches Uberblick 317
6.6.2. Methodologische Prinzipien 318
6.6.2.1. Eigenschaften des Amplifikationzyklus 319
6.6.2.2. DNS Untersuchung durch PCR 322
6.6.3. Anwendungen der PCR Methode 323
6.6.3.1. Anwendung in Diagnose 323
6.6.3.1.1. Anwendung in Eredopathologie 323
6.6.3.1.2. Anwendung in Onkologie 324
6.6.3.1.3. Anwendung in Infektiondetektion 324
6.6.3.2. Anwendung in Gerichtsmedizin 325
6.6.3.3. Anwendung in Gynekologie 326
6.6.3.4. Anwendung in Genomkartierung 326
6.7. Vielgestaltung der Länge des Restriktionsfragmentes (RFLP) 327
6.7.1. Synoptisches Uberblick 327
6.7.2. Methodologische Prinzipien 328
6.7.3. Anwendung der RFLP Methode 330
6.7.3.1. Revers Genetik 331
6.7.3.2. DNS Abdruck 334
6.8. Genische Rekombinierung – Synopsis 335
6.8.1. Genetransfer mit der Hilfe der Plasmiden 336
6.8.1.1. Methoden zur Verwendung von genomische DNS 337
6.8.1.2. Methoden zur Verwendung von boten RNS 338
6.8.2. Genetransfer mit der Hilfe der Viren 339
7. Naturelle Generekombinierung 341
7.1. Allgemeines 341
7.2. Generekombinierung in Viren 342
7.3. Generekombinierung in Prokaryonten 344
7.3.1. Verwandlung 345
7.3.2. Konjugation 348

7.3.3. Sexduktion 350
7.3.4. Transduktion 351
7.4. Generekombinierung in Eukaryonten 354
8. Biotechnologisch vermittelte Generekombinierung 357
8.1. Allgemeines 357
8.2. Operationsmitteln für rekombinant DNS 358
8.2.1. Restriktion- und Modifikationenzymen 358
8.2.1.1. Restriktionenzymen 361
8.2.1.2. Modifikationenzymen 364
8.2.2. Enzymen aus der DNS-Polymerasen Gruppe 365
8.2.2.1. DNS-Polymerasen-DNS abhängig 365
8.2.2.2. DNS-Polymerasen-RNS abhängig 367
8.2.3. Enzymen aus der DNS-Ligasen Gruppe 368
8.3. Strategien für Erhaltung der rekombinant DNS 369
8.3.1. Allgemeine Prinzipien 369
8.3.2. Konzept von Vektor 370
8.3.2.1. Plasmide 371
8.3.2.2. Bakteriophagen 373
8.3.2.3. Kosmide 375
8.3.3. Konzept von Passagier 376
8.3.4. Bildung der rekombinant DNS Molekülen 377
8.3.5. Klonierung der rekombinant DNS 380
Bibliographie (selektiv) 383

TEIL III. ANWENDUNGEN DER MOLEKULARBIOLOGIE 389
9. Anwendungen in Biotechnologie 391
9.1. Allgemeines 391
9.2. Spezifizität der Anwendungsgebiete 391
9.3. Anwendungen mit pharmazeutische Interesse 392
9.3.1. Somatostatin 393
9.3.2. Insulin 394
9.3.3. Somatotrophes Hormon 396
9.4. Anwendungen mit Interesse für Lebensmittelindustrie 397
9.4.1. Enzymen als Lebensmittelzusatzstoffe 397
9.4.1.1. Enzymen in die allgemeine Biochemie 398
9.4.1.2. Enzymen in Lebensmittelbiotechnologie 403
9.4.2. Erhaltung von enzymatische mikrobiologische Zusatzstoffe 405
9.4.3. Erhaltung von enzymatische biochemische Zusatzstoffe 406

9.4.4. Erhaltung von enzymatische Präparate durch Methoden spezifisch für die Molekularbiologie 407
9.4.5. Nachforschung mancher enzymatischen Systeme in situ 409
9.5. Anwendungen mit Bezug auf Tiere 411
9.6. Anwendungen mit Bezug auf Pflanzen 414
9.7. Anwendungen mit agrobiologische Interesse 418
9.7.1. Synoptisches Ubersicht 418
9.7.2. Transgenese: von Konzept nach Anwendungen 419
9.7.2.1. Gentransfer Methoden 419
9.7.2.2. Transgenese Etappen 420
9.7.3. Anwendungen der genetisch veränderter Organismen in der Landwirtschaft 421
9.7.4. Anwendungen der genetisch veränderter Organismen in der Tierzucht 422
9.7.5. Transgenizität und Umwelt 423
9.8. Biotechnologien – Synopsis 426
9.8.1. Interdisziplinäre Aspekte 426
9.8.2. Zusammenbindungen der Biotechnologien 427
9.8.2.1. Biologische Prozeße 427
9.8.2.2. Technologische Austattung 428
9.8.2.3. Industrielle Verfahren 428
10. Biomedizinische Anwendungen 429
10.1. Allgemeines 429
10.2. Untersuchungen der Filiationniveaus 429
10.3. Vorgeburt Diagnose 430
10.4. Erhaltung der chemischen Vermittlers für die Imunantwort 431
10.4.1. Interferons 431
10.4.2. Interleukine 434
10.5. Erhaltung der Impfstoffe 436
10.6. Untersuchungen in Gerichtsmedizin 437
10.7. Kartierung des Menschgenoms 438
11. Chronobiochemische Anwendungen 441
11.1. Allgemeines 441
11.2. Biorhytmen und Molekularbiologie 443
11.2.1. Periodizität der Biorhytmen 443
11.2.2. Bedingungen der Biorhytmen 444
11.3. Haupttypen von Biorhytmen 445
11.3.1. Ultradienische Biorhytmen 445

11.3.2. Cirkadienische Biorhytmen 445
11.3.3. Infradienische Biorhytmen 448
11.4. Chronobiochemische Parameter der biologischen Biorhytmen 450
11.5. Autonomie und Synchronisation der Biorhytmen 451
11.5.1. Autonomie der Biorhytmen 452
11.5.2. Synchronisation der Biorhytmen 453
11.6. Molekularbiologie und Chronobiochemie in Alterung 455
12. Anwendungen in der Studie von Xenobiotika 459
12.1. Allgemeines 459
12.2. Xenobiotika mit Interesse für Lebensmitteln 461
12.2.1. Nahrungszusätze 462
12.2.2. Nahrungs chemische Schadstoffen 467
12.3. Xenobiotika mit pharmazeutischen Interesse 470
12.3.1. Chemioterapische Medikamente 470
12.3.2. Cytostatische Chemiotherapika 471
12.4. Xenobiotika mit Interesse für Ernährung und die chemische Karcinogenesis 472
12.4.1. Synoptisches Ubersicht 472
12.4.2. Deoxyribonukleinsäure in die chemische Karcinogenesis 473
12.4.3. Interaktion mancher polycyklischen organischen Zusammensetzungen und mancher Metalionen mit DNS 475
12.4.4. DNS Adukten mit polycyklische organische Zusammensetzungen und Metalionen 482
12.5. Xenobiotika mit pharmazeutischen Interesse verbraucht in die cytostatische Chemiotherapie 488
12.5.1. Synoptisches Ubersicht 488
12.5.2. Deoxyribonukleinsäure in die cytostatische Chemiotherapie 489
12.5.3. Interaktion mancher cytostatischen Chemiotherapika mit DNS 492
12.5.4. Komplexe DNS-Cytostatika 493
Bibliographie (selektiv) 499

Addenda 509
Glossar 515
Index 527

SOMMAIRE

PART I. CONCEPTS ET METHODES 1
1. Biologie moléculaire dans l'étude de la matière vivante 3
1.1. Considérations générales 3
1.2. Diversité morphophysiologique de la matière vivante. 5
1.3. Objet de la biologie moléculaire. Interdisciplinarité 8
1.4. Historique 10
1.5. Eléments morphophysiologiques et topobiochimiques spécifiques pour les virus 14
1.5.1. Tableau synoptique 14
1.5.2. Ultrastructure et topobiochimie des virus 15
1.5.2.1. Tête 17
1.5.2.1.1. Core 19
1.5.2.1.2. Capside 20
1.5.2.1.3. Peplos 21
1.5.2.2. Queue 22
1.5.2.2.1. Cylindre axiale 22
1.5.2.2.2. Plaque bazale 23
1.5.2.2.3. Fibres terminales 23
1.5.3. Cycle vital aux virus 24
1.5.3.1. Cycle lythique 24
1.5.3.2. Cycle lysogène 25
1.6. Eléments morphophysiologiques et topobiochimiques spécifiques pour les procaryotes 27
1.6.1. Tableau synoptique 27
1.6.2. Ultrastructure et topobiochimie des procaryotes 29
1.6.2.1. Nucléoide 31
1.6.2.2. Cytoplasme 32
1.6.2.3. Formations intracellulaire 33
1.6.2.3.1. Ribosomes 33
1.6.2.3.2. Mesosomes 34

BCU IASI UNIVERSITY LIBRARY

1.6.2.3.3. Plasmides 35
1.6.2.3.4. Granules dépositaires 36
1.6.2.3.5. Vacuoles 36
1.6.2.3.6. Appareil photosynthétisant 37
1.6.2.3.7. Autres formations intracellulaires 37
1.6.2.4. Membrane cellulaire 38
1.6.2.5. Fléaux, pili, fimbrines 40
1.6.3. Cycle cellulaire aux procaryotes 40
1.7. Eléments morphophysiologiques et topobiochimiques spécifiques pour les eucaryotes 41
1.7.1. Tableau synoptique 41
1.7.2. Ultrastructure et topobiochimie des eucaryotes 42
1.7.2.1. Noyaux 45
1.7.2.2. Cytoplasme 46
1.7.2.3. Organites cellulaires 47
1.7.2.3.1. Mitochondrie 47
1.7.2.3.2. Réticulum endoplasmique. Ribosomes 49
1.7.2.3.3. Complexe Golgi 52
1.7.2.3.4. Peroxisomes 52
1.7.2.3.5. Glyoxisomes 53
1.7.2.3.6. Lysosomes 54
1.7.2.3.7. Centrosome 55
1.7.2.3.8. Plastides 55
1.7.2.3.9. Vacuoles 57
1.7.2.4. Cytosquelette 57
1.7.2.5. Membrane cellulaire 58
1.7.2.5.1. Caractéristiques ultrastructurelles des biomembranes 59
1.7.2.5.2. Rôle biologique des membranes 61
1.7.2.6. Barières membranaires des cellules 63
1.7.2.6.1. Systèmes de transport – généralités 64
1.7.2.6.2. Systèmes de microtransport 65
1.7.2.6.2.1. Transport trasnsmembranaire passif 65
1.7.2.6.2.2. Transport trasnsmembranaire actif 73
1.7.2.6.3. Systèmes de macrotransport 75
1.7.2.6.3.1. Endocytose 75
1.7.2.6.3.2. Exocytose 77
1.7.2.6.3.3. Spécificité des systèmes de macrotransport 77

BCU IASI/CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

1.7.2.7. Matrice extracellulaire 78
1.7.2.7.1. Constitution de matrice extracellulaire 79
1.7.2.7.2. Interaction cellule-matrice extracellulaire 81
1.7.3. Cycle cellulaire 82
1.7.4. Tanatocytose – un concept accréditable 84
2. Investigation de l`ultrastructure et des bioconstituents 89
2.1. Méthodologie générale des investigations 89
2.1.1. Matérielles biologiques 90
2.1.1.1. L`organism animal intact 90
2.1.1.2. Organelles 91
2.1.1.3. Cellules 92
2.1.1.4. Constituents subcellulaire 93
2.1.1.5. Virus 93
2.1.1.6. Enzymes isolées 93
2.1.2. Procédés microscopiques 94
2.1.2.1. Principles généraux 95
2.1.2.2. Types des procédés microscopiques 97
2.1.2.3. Microscopie fotonique 97
2.1.2.3.1. Le microscope fotonique 97
2.1.2.3.2. Techniques spécifiques 99
2.1.2.4. Microscopie électronique 101
2.1.2.4.1. Le microscope électronique 102
2.1.2.4.2. Techniques spécifiques 103
2.1.2.5. Procédés microscopiques dans l`étude des acidees nucléiques cellulaire 106
2.1.2.5.1. Procédés spécifiques pour la citochimie classique 107
2.1.2.5.2. Procédés microscopiques spécifiques pour la biologie moléculaire 108
2.1.2.5.3. Procédés spécifiques pour la morphologie et la pathologie 109
2.1.3. Méthodes biochimiques 110
2.1.3.1. Méthodes analitiques métaboliques 113
2.1.3.2. Méthodes des mutants auxotrophes 113
2.1.3.3. Méthodes isotopiques 114
2.1.3.3.1. Utilisation des isotopes stables 115
2.1.3.3.2. Utilisation des isotopes radioactifs 115
2.1.3.4. Méthodes cromatographiques 118
2.1.3.4.1. Chromatographie sur colonne 118
2.1.3.4.2. Chromatographie sur papier 120

BCU IAȘI CENTRALA UNIVERSITARĂ LIBRARY

2.1.3.5. Méthodes spectrométriques 122
2.3.1.5.1. Spectrométrie d'absorption 128
2.3.1.5.2. Spectrométrie d'emission 133
2.3.1.5.3. Spectrométrie avec des rayons X 135
2.3.1.5.4. Spectrométrie de fluorescence 139
2.1.3.6. Méthodes stéreochimiques 141
2.1.3.7. Méthodes électrophorétiques 145
2.1.4. Possibilités d'investigation integrée 147
2.2. Ultrastructure des constituants cellulaires 148
2.2.1. Rôle des techniques cyto- et histochimiques 148
2.2.2. Fractionnement des constituants cellulaires 149
2.2.2.1. Principe de la centrifugation 150
2.2.2.2. Types des centrifugation 152
2.2.2.2.1. Centrifugation simple 152
2.2.2.2.2. Centrifugation de zone 154
2.2.2.2.3. Centrifugation isopicnique 154
2.2.2.3. Implications de fractionnement cellulaire 155
3. Acidees nucléiques : structure chimique - activité biologique 157
3.1. Considérations générales 158
3.2. Components structurelles 160
3.2.1. Pentoses 160
3.2.2. Nucléobases 161
3.2.2.1. Nucléobases pyrimidiniques 162
3.2.2.2. Nucléobases puriniques 163
3.2.2.3. Nucléobases avec incidence réduit 164
3.2.2.4. Tautomérie des nucleobases 166
3.2.3. L'acidee phosphorique 169
3.3. Précurseurs structurelles 170
3.3.1. Nucléosides 170
3.3.2. Nucléotides 173
3.3.2.1. Mononucléotides 173
3.3.2.2. Derivatívés nucléotidiques 176
3.3.2.2.1. Nucléotid polyphosphates 176
3.3.2.2.2. Polynucléotides 178
3.4. Acidees nucléique et les nucléoproteides 179
3.4.1. Particularités structurelles généralles 179
3.4.2. Liaisons chimiques intramoléculaire 181
3.5. Acidees désoxyribonucléotidiques 184

3.5.1. Structure chimique 184
3.5.1.1. Structure primaire 185
3.5.1.2. Structure secondaire 190
3.5.1.3. Structure tertiare 193
3.5.1.4. Structure quaternaire 196
3.5.2. Gendres des acidees désoxyribonucléiques 197
3.5.2.1. DNA avec dextro-rotation 197
3.5.2.1.1. Particularités structurelles stéréochimiques 197
3.5.2.1.2. Eléments déscriptifs regardant les gendres des DNA 201
3.5.2.2. DNA avec senestro-rotation 202
3.5.2.3. Forces intramoléculaire spécifiques pour le DNA 204
3.5.2.4. Dextrorotation et senestrorotation chez le DNA 205
3.5.3. Particularités topologiques chez le DNA 206
3.6. Acidees ribonucléiques 209
3.6.1. Structure chimique 210
3.6.1.1. Structure primaire 210
3.6.1.2. Structure secondaire 212
3.6.1.3. Structure tertiare 213
3.6.2. Types des acidees ribonucléiques 215
3.6.2.1. RNA messager 216
3.6.2.2. RNA de transfert 217
3.6.2.3. RNA ribosomal 220
3.6.2.4. Petit RNA nucléaire 221
3.6.2.5. Conformations macomoléculaires chez le RNA 221
4. Acidees nucléiques dans la biologie moléculaire moderne 223
4.1. Considérations générales 223
4.2. Gènes, acidees nucléiques, génie génétique 225
4.2.1. Tableau synoptique 225
4.2.2. L`information biologique et les acides nucléiques 229
4.3. Rélation DNA-filiation moléculaire 233
4.3.1. Niveaux de filiation 233
4.3.2. La matière vivante et les séquences du DNA 234
4.4. Structures éléctroniques aux nucléobases; particularités,importance 235
Bibliographie (sélective) 239

PART II. METHODES SPECIFIQUES DANS LA BIOLOGIE MOLECULAIRE 243
5. Génome et recombinaison gènique 245
5.1. Considerations générales 245

5.1.1. Génome aux virus....248
5.1.2. Génome aux procaryotes....251
5.1.3. Génome aux eucaryotes....253
5.2. Interrélation génotype-phénotype-milieu....254
5.2.1. Concept du génotype....255
5.2.2. Concept de phénotype....256
5.2.3. Action du milieu....256
5.2.4. Les gènes et le programme génétique – généralités....258
5.3. Transmission de l`information génique....259
5.3.1. Tableau synoptique....259
5.3.2. Processus de réplication....260
5.3.3. Processus de transcription....265
5.3.4. Processus du translation....269
5.3.4.1. Spécificité de la translation....269
5.3.4.2. Caractéristiques du code génétique....272
5.3.4.3. L`appareil de translation....276
5.3.4.4. Activation des aminoacidees....278
5.3.4.5. Biosynthèse de protéines – étapes....280
5.3.4.6. Energogénèse et régulation de la biosynthèse des proteines....285
6. Investigation des acidees nucléiques....287
6.1. Considération générales....287
6.2. Méthodes pour déterminer les séquences d'une molecule d'acide nucléique....289
6.2.1. Tableau synoptique....289
6.2.2. Méthode de Maxam et Gilbert....290
6.2.3. Méthode de Sanger-Nicklen-Coulsen....292
6.3. Méthodes d'hybridation en chaîne des acidees nucléiques....295
6.3.1. Tableau synoptique....295
6.3.2. Types d'hybridation....295
6.3.3. Dissociation et association des acidees nucléiques....297
6.3.3.1. Dissociation des acidees nucléiques....298
6.3.3.1.1. Effet hyperchromic....298
6.3.3.1.2. Température de fusion....299
6.3.3.2. Association des acidees nucléiques....301
6.3.3.2.1. Reassociation DNA mc / DNA mc....305
6.3.3.2.2. Hybridation DNA mc / RNA mc....306
6.3.4. Méthodes d'investigation des réactions de dissociation et association....309
6.4. Méthodes de détection par des sondes moléculaire....310
6.4.1. Tableau synoptique....310

6.4.2. Sondes moléculaires radiomarquées 312
6.4.3. Sondes moléculaires chimiomarquées....313
6.4.3.1. Sondes moléculaires chimiomarquées directement 313
6.4.3.2. Sondes moléculaires chimiomarquées indirectement 313
6.5. Méthodes d'investigation des fragments moléculaires des acidees nucléiques....314
6.5.1. Tableau synoptique....314
6.5.2. Méthode de Southern 314
6.5.3. Méthode de Northern....316
6.6. Méthodes d'amplification par PCR....317
6.6.1. Tableau synoptique....317
6.6.2. Principes méthodologiques 318
6.6.2.1. Particularités du cycle d'amplification 319
6.6.2.2. Investigation du DNA comme la méthode d'amplification par PCR....322
6.6.3. Application de la méthode d'amplification par PCR 323
6.6.3.1. Applications dans le diagnostic 323
6.6.3.1.1. Applications dans l'hérédopathologie 323
6.6.3.1.2. Applications dans l'oncologie 324
6.6.3.1.3. Applications dans la détection d'infections....324
6.6.3.2. Applications dans la médicine légale....325
6.6.3.3. Applications dans la gynécologie 326
6.6.3.4. Applications dans la cartographie du génome 326
6.7. Méthodes d'évaluation du polymorphisme de la longeur du fragment de restriction (RFLP) 327
6.7.1. Tableau synoptique....327
6.7.2. Principes méthodologiques 328
6.7.3. Applications des méthodes d'évaluation de RFLP....330
6.7.3.1. Génétique inverse 331
6.7.3.2. L'empreinte DNA 334
6.8. Recombinaison génique – synoptique....335
6.8.1. Transfert des gènes à l'aide des plasmides....336
6.8.1.1. Procédures d'utilisation du DNA génomique....337
6.8.1.2. Procédures d'utilisation du RNA messager....338
6.8.2. Transfert des génes à l'aide des virus....339
7. Récombinaison génique naturelle 341
7.1. Considérations générales....341
7.2. Récombinaison génique aux virus....342
7.3. Récombinaison génique aux procaryotes 344
7.3.1. Transformation 345

7.3.2. Conjugaison....348
7.3.3. Sexduction....350
7.3.4. Transduction....351
7.4. Récombinaison génique aux eucaryotes....354
8. Récombinaison génique et par la médiation de la biotechnologie....357
8.1. Considérations générales....357
8.2. Moyens operatoires pour DNA recombinant....358
8.2.1. Enzymes de réstriction et modification....358
8.2.1.1. Enzymes de réstriction....361
8.2.1.2. Enzymes de modification....364
8.2.2. Enzymes du groupe de DNA polymerases....365
8.2.2.1. DNA polymerases-DNA dépendantes....365
8.2.2.2. DNA polymerases-RNA dépendantes....367
8.2.3. Enzymes du groupe des DNA ligases....368
8.3. Stratégie d'obtention du DNA recombinant....369
8.3.1. Principes généraux....369
8.3.2. Concept de vecteur....370
8.3.2.1. Plasmides....371
8.3.2.2. Le phage....373
8.3.2.3. Cosmides....375
8.3.3. Concept de passager....376
8.3.4. Formation des molécules DNA recombinant....377
8.3.5. Clonage du DNA recombinant....380
Références bibliographiques (séléctives)....383

PART III. APPLICATIONS DE LA BIOLOGIE MOLÉCULAIRE....389
9. Applications biotechnologiques....391
9.1. Considérations générales....391
9.2. Spécificité des domaines d'application....391
9.3. Applications à intérêt pharmaceutique....392
9.3.1. Somatostatine....393
9.3.2. Insuline....394
9.3.3. Hormone somatotrope....396
9.4. Applications à intérêt alimentaire....397
9.4.1.Enyzmes comme additifs alimentaires....397
9.4.1.1. Enzymes dans la biochimie générale....398
9.4.1.2. Enzymes dans la biotechnologie alimentaire....403
9.4.2. Obtention des additifs enyzmatiques mcrobiologiques....405

9.4.3. Obtention des additifs enyzmatiques biochimiques 406
9.4.4. Obtention des préparés enyzmatiques par des méthodes spécifiques pour la biologie moléculaire 407
9.4.5. Investigation on systèmes enzymatiques in situ 409
9.5. Applications concernant les animaux 411
9.6. Applications concernant les plantes 414
9.7. Applications à intérêt agrobiologiques 418
9.7.1. Tableau synoptique 418
9.7.2. Transgénèse: de la concept à l'application 419
9.7.2.1. Méthodes de transfert des gènes 419
9.7.2.2. Les étapes de la transgénèse 420
9.7.3. Applications concernant les organismes génétiquement modifié dans l'agriculture 421
9.7.4. Applications concernant les organismes génétiquement modifié dans la zootechnie 422
9.7.5. Transgénicité et le milieu environnant 423
9.8. Biotechnologies – tableau synoptique 426
9.8.1. Interdisciplinarité 426
9.8.2. Interconnexions des biotechnologies 427
9.8.2.1. Processus biologiques 427
9.8.2.2. Equipements technologiques 428
9.8.2.3. Procédés industriels 428
10. Applications biomédicales 429
10.1. Considérations générales 429
10.2. Exploration des niveaux de filiation 429
10.3. Diagnostic prénatal 430
10.4. Obtention des médiateurs chimiques pour la reponse imune 431
10.4.1. Interferons 431
10.4.2. Interleukines 434
10.5. Obtention des vaccins 436
10.6. Investigations dans la médicine légale 437
10.7. La cartographie du génome humain 438
11. Applications à intérêt chronobiochimique 441
11.1. Considérations générales 441
11.2. Biorhythms et la biologie moléculaire 443
11.2.1. Periodicité des biorhythms 443
11.2.2. Conditionnement des biorhythms 444
11.3. Principaux types des biorhythms 445

11.3.1. Biorhythms ultradienne 445
11.3.2. Biorhythms circadienne 445
11.3.3. Biorhythms infradienne 448
11.4. Paramètres chronobiochimiques spécifiques pour les rhythms biologiques 450
11.5. Autonomie et synchronisation des biorhythms.....451
11.5.1. Autonomie des biorhythms.....452
11.5.2. Synchronisation des biorhythms.....453
11.6. Implications de la biologie moléculaire et de la chronobiochimie dans la sénéscence 455
12. Applications dans l'étude des xenobiotiques 459
12.1. Considérations générales.....459
12.2. Xenobiotics à intérêt nutritionel.....461
12.2.1. Additifs alimentaires 462
12.2.2. Polluants chimiques alimentaires 467
12.3. Xenobiotics à intérêt farmaceutique 470
12.3.1. Médicaments chimiothérapiques 470
12.3.2. Chimiothérapiques citostatiques 471
12.4. Xenobiotics avec action dans la mutagénèse et la carcinogénèse chimique 472
12.4.1.Tableau synoptique.....472
12.4.2. Acide deoxyribonucléique et la carcinogénèse.....473
12.4.3. Interaction des quelques composées organiques polycycliques et des quelques ions métalliques avec l'ADN.....475
12.4.4. Adducts ADN avec composées organiques polycycliques et ions métalliques.....482
12.5. Xenobiotics utilisés dans la chimiothérapie citostatiques.....488
12.5.1. Tableau synoptique.....488
12.5.2. L'acide désoxyribonucléiques dans la chimiothérapie citostatique 489
12.5.3. Interaction des quelques chimiothérapiques citostatiques avec l' ADN.....492
12.5.4 .Complexes ADN - citostatiques 493
Références bibliographiques (séléctives).....499

Addenda 509
Glossaire minimal 515
Index des sujets 527

BCU IASI / CAROL I UNIVERSITY LIBRARY

ABREVIERI SI SIMBOLURI

ABREVIERI

A: adenina
AA sau aa: aminoacid (aminoacizi)
AAE: aminoacizi esenţiali
Ala: alanina
Arg: arginina
Asn: aspargina
Asp: acid aspartic
Cys: cisteina
$(Cys)_2$: cistina
Glu: acid glutamic
Gli: glicina
His: histidina
Leu: leucina
Lys: lisina
Met: metionina
Phe: fenilalanina
Pro: prolina
Ser: serina
Thr: treonina
Trp: triptofan
Tyr: tirosina
Val: valina
AC: anticorp
ADP: acid adenozin -5'- difosforic (adenozindifosfat)
AFP: α - fetoproteină
AG: antigen
AGL: acizi graşi liberi
AGE: acizi graşi esenţiali
AMP: acid adenozin -5'- monofosforic (adenozinmonofosfat)
ATP: acid adenozin -5'- trifosforic (adenozintrifosfat)
A/T: raporturi molare la nucleobaze A şi T
A–T: nucleobaze complementare
A+G/T+C: raporturi molare ale nucleobazelor sumate
C: citozina
CoA sau HS-CoA: coenzima A
COL: colesterol
CDP: acid citidin-5'- difosforic (citidindifosfat)
CMP: acid citidin-5'-monofosforic (citidinmonofosfat)
CTP: acid citidin-5'- trifosforic (citidintrifosfat)
dA: deoxiriboadenozină
rA: riboadenozină
dC: deoxiribocitidină
rC: ribocitidină
dG: deoxiriboguanozină
rG: riboguanozină
rU: ribouridină
dT: deoxiribotimidină
dNTP: deoxiribonucleotidtrifosfat (N: nucleobaza)
ddNTP: dideoxiribonucleotidtrifosfat (N: nucleobaza)
DNA (ADN): acid deoxiribonucleic
DNA-DNA: hibridare catene identice DNA
DNA-RNA: hibridare catene diferite DNA şi RNA
A-DNA; B-DNA;
C-DNA; D-DNA: familii de DNA cu dextrorotaţie
cDNA: DNA complementar

BCU "A.C. CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

DNA-Z: DNA cu senestrorotaţie
ER: enzimă de restricţie, e.g.:
Bam HI: enzimă de restricţie de la Bacillus amyloliquefaciens
Eco RI: enzimă de restricţie de la Esherichia coli
G: guanină
GABA: acid γ -aminobutiric-
GalNAc: galactoza N-acetilată
G/C: raporturi molare la nucleobazele G şi C
G-C: nucleobaze complementare
GPD: acid guanozin -5'- difosforic
GMP: acid guanozin -5'- monofosforic (guanozinmonofosfat)
GTP: acid guanozin -5'- trifosforic (guanozintrifosfat)
Ig: imunoglobuline
LP: lipoproteine
HbA: hemoglobina adultă
HDL: lipoproteine cu densitate ridicată
HGM: Human Gene Mapping (Harta Genei Umane) termen general acreditat
HIV: Virusul Imunodeficienţei Umane (Human Immunodeficiency Virus)
izomeria D-L: seriilor D şi L
izomeria R-S: stereoizomeria rectus-sinister
LT: leucotriene (tipuri: A, B, C, D, E)
McK: numărul din "catalogul McKusick" (redă inheritanţa mendeliană la om)
MG: monoglucide
Fru: fructoza
Fuc: fucoza
Gal: galactoza
Glc: glucoza
Man: manoza
Rha: ramnoza
Rib: riboza
Xyl: xiloza
mt-DNA – DNA mitocondrial
NANA: acid neuraminic N – acetilat
PCR: Polymerase Chain Reaction - metodă de studiu a microfragmentelor de DNA in vitro, i.e. "reacţia în lanţ a polimerazei"
PG: prostaglandine (tipuri: A, B, E, F)
PGI: prostaglandine de tip I
poli A: acid poliadenilic
poli U: acid poliuridilic
Pu: purina
Py: pirimidina
RNA (ARN): acid ribonucleic
rRNA: RNA ribosomal
mRNA: RNA mesager
hmRNA: RNA nuclear heterogen
RFLP: Restriction Fragment Length Polymorphism -metodă de evaluare a "polimorfismului lungimii fragmentului de restricţie" al DNA
sisteme R-M: sisteme de restricţie-modificaţie
T: timina
TDP: acid timidin -5'- difosforic (timidindifosfat)
TMP: acid timidin -5'- monofosforic (timidinmonofosfat)
TTP: acid timidin -5'- trifosforic (timidintrifosfat)
TX: tromboxani (tipuri A, B)
U: uracil
UDP: acid uridin -5'- difosforic (uridindifosfat)
UMP: acid uridin -5'- monnofosforic (uridinmonofosfat)
UTP: acid uridin -5'- trifosforic (uridintrifosfat

SIMBOLURI

C- concentraţie
cM- centiMorgan
C*- atom de C asimetric
D, L- stereoizomeri
Da- Dalton (i)
ΔE- variaţia energiei interne
ΔG- variaţia entalpiei libere
ΔG^0- variaţia energiei libere standard
ΔG^{01}- variaţia energiei libere standard la pH=7
H- entalpia
K- constanta de echilibru
K_a- constanta de aciditate
K_b- constanta de bazicitate
kb- kilobaze (10 perechi de nucleobaze la DNA sau 10 nucleobaze la RNA)
M sau mol- molaritatea soluţiei
Mb- megabaze (1000 perechi de nucleobaze) la DNA
n-indice de refracţie
N- normalitatea soluţiei
N_A- numărul lui Avogadro
Osm: osmol
~P sau ~ (P)- legătura fosfat macroergică
pH_i- pH-ul izoelectric
P_i sau P_a-fosfat anorganic (acid fosforic)
PP_i sau PP_a–ortofosfat (acid ortofosforic)
R- constanta universală a gazelor
S - Svedberg (unitate de măsură a constantei de sedimentare)
ΔS- variaţia entropiei
S_{20w}- constanta de sedimentare
T- temperatura (în grade Kelvin)
V- volum
μ- forţa ionică
ρ- densitatea soluţiei
π- orbital molecular de legătură
π*- orbital molecular de antilegătură
λ- lungime de undă
$[\alpha]^{20}_D$- rotaţie specifică (la 20°C în spectrul D din radiaţia Na)
α, β- anomeri
(+)- enantiomer dextrogir
(-)- enantiomer levogir
(±)- amestec racemic

BCU IASI/CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

BCU IASI/CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

PARTEA I

CONCEPTE SI METODE GENERALE

1. Biologia moleculară în studiul materiei vii 3

2. Investigarea ultrastructurii şi bioconstituenţilor 89

3. Acizii nucleici: structura chimică-activitate biologică 157

4. Acizii nucleici în biologia moleculară modernă 223

Referinţe bibliografice (selective) 239

BCU IASI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

BCU IASI/CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

1. BIOLOGIA MOLECULARĂ ÎN STUDIUL MATERIEI VII

1.1. CONSIDERATII GENERALE

Biologia moleculară şi-a marcat apariţia treptat, odată cu progresele realizate în domenii ştiinţifice conexe, între acestea un rol preponderent având biochimia, genetica, microbiologia, fizico-chimia şi fizica, remarcându-se astfel caracterul inter- şi multidisciplinar al acestei ştiinţe.

Progresele în Biologia celulară şi moleculară s-au realizat de-a lungul secolelor. Cunoştinţele acumulate au condus iniţial la constituirea citologiei (Schleiden, 1838; Schwann, 1839) urmată de conturarea domeniului "*biologiei celulare*". Ulterior a fost formulat şi conceptul de "*patologie celulară*" introdus de către Wirchow (1858). Contribuţiile remarcabile ale Biologiei celulare s-au validat prin studiul particularităţilor morfofiziologice şi topobiochimice. In acest context se menţionează că în Biologia celulară un moment crucial a fost reprezentat de cercetările asupra ultrastructurii materiei vii acelulare (i.e. la virusuri) şi celulare (i.e. la procariote şi eucariote).

In prima jumătate a acestui secol Biologia celulară şi moleculară au evoluat sprijinindu-se reciproc pe informaţiile obţinute. Astfel, spre exemplu, descoperirile efectuate de Griffith (1928) privind procesul de transformare a pneumococilor a putut fi corelat cu demonstrarea de către Avery et al. (1944) a faptului că acidul deoxiribonucleic (DNA) este substratul material (biochimic) al eredităţii microbiene. In acelaşi context se înscrie şi descoperirea de către Luria şi Delbruck (1943) a caracterului spontan al mutaţiilor bacteriene prin testul fluctuaţiei. Aceste constatări au premers demonstrarea identităţii unor căi biochimice (biochemical pathways) ale transformărilor specifice atât microorganismelor cât şi organismelor superioare.

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Descoperirile ştiinţifice, realizate în timp, au condus la acreditarea unor noi concepte şi la utilizarea de noi metode, trecând de la pleiada tehnicilor microscopice (fotonică şi electronică) spre metode biochimice bazate, în principal, pe metode chimice şi fizico-chimice (instrumentale) remarcabile prin acurateţe, prin caracterul neinvaziv şi prin reproductibilitate.

Progresele în *Biologia moleculară* – denumire introdusă de Astbury în 1950 – au fost realizate într-o perioadă relativ scurtă, majoritatea înscriindu-se în ultimele patru decenii ale secolului XX. In acest context se remarcă faptul că investigaţiile întreprinse în domeniul morfopatologiei şi fiziopatologiei au condus la conceptul de "*patologie moleculară*", introdus de Schade (1923). Astfel se poate conchide că există o prioritate a concetului de "patologie moleculară" vis-a-vis de acela de "*biologie moleculară*".

In a doua jumătate a secolului XX au fost realizate descoperiri referitoare la structura biomacromoleculelor de acizi nucleici (acidul deoxiribonucleic -DNA şi acidul ribonucleic - RNA) şi de proteine, descifrarea codului genetic, biosinteza proteinelor, recombinarea genică naturală şi mediată biotehnologic etc. Un rol important în dezvoltarea cunoştinţelor şi evoluţia biologiei moleculare au avut şi studiile asupra proceselor de morfogeneză – în general, şi de embriogeneză – în special, vizând aspectele moleculare ale reproducerii, creşterii, dezvoltării etc.

Descoperirea tehnicilor de manipulare a DNA cromosomal, DNA plasmidal, DNA bacteriofagal ş.a., au contribuit la circumscrierea unui nou domeniu, acela al ingineriei genetice. In cadrul acestuia s-a dezvoltat şi tehnologia (i.e. biotehnologia) DNA recombinant, care a fost receptată ca o "revoluţie în biologie", oferind mijloace aplicative biotehnologiilor moderne.

Dezvoltarea metodologiilor moderne de lucru în investigarea DNA a făcut posibilă, de asemenea, elucidarea unora din mecanismele specifice patologiei biochimice cu referire la procesele de carcinogeneză şi mutageneză induse de agenţi fizici (e.g. radiaţii ionizante, radiaţii ultraviolete), chimici (e.g. hidrocarburi aromatice policiclice, ioni metalici, compuşi alchilanţi etc.) şi biologici (e.g. oncovirusuri).

In biochimia şi biologia moleculară modernă s-au făcut referiri concrete la aşa numita "revoluţie metodologică". In acest cadru s-au discutat : transcrierea "in vitro" a unei secvenţe de RNA mesager (mRNA) într-o secvenţă de DNA complementar (cDNA) sub acţiunea reverstranscriptazei; clivajul (secţionarea) macromoleculei de DNA cu ajutorul enzimelor de restricţie (ca urmare a descoperirii fenomenului de restricţie-modificaţie); recombinarea DNA in vitro prin utilizarea DNA ligazelor; perfectarea procedurilor care asigură clonarea de gene – dependente de recombinarea genică in vitro ş.a.

La realizarea progreselor în Biologia moleculară au contribuit tehnicile microscopice - caracteristice biologiei celulare şi metodele biochimice - caracteristice biologiei celulare şi

moleculare. Astfel a fost posibilă perfecţionarea continuă a unor *metode specifice biologiei moleculare*, între acestea menţionându-se : a) metodele de secvenţializare pentru catene de DNA (metoda Maxam-Gilbert, metoda Sanger-Nicklen-Coulsen); b) metoda de hibridizare; c) metodele de detectare cu sonde moleculare (radio- şi chimiomarcate); d) metode de determinare a fragmentelor de acizi nucleici (metodele Southern şi Northern); metoda amplificării prin reacţia în lanţ a polimerazei, i.e. metoda PCR (Polymerase Chain Reaction); e) metoda evaluării polimorfismului lungimii fragmentului de restricţie, i.e. metoda RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism). Aceste metode şi-au aflat ulterior importante aplicaţii de interes biotehnologic şi biomedical.

Prima parte a acestui volum este destinată, în principal, expunerii generale a problemelor conceptuale şi a metodelor uzitate în Biologia moleculară. Aceste cunoştinţe preliminare - de interes teoretic şi aplicativ - se impun atenţiei atestând profunda implicare a biologiei moleculare, îndeosebi problematica referitoare la acizii nucleici, în biotehnologiile moderne, investigaţiile biomedicale (diagnostic, terapie), cronobiochimie, patologie biochimică (patobiochimie) etc.

1.2. DIVERSITATEA MORFOFIZIOLOGICĂ A MATERIEI VII

Tratarea noţiunilor generale privitoare la *materia vie* porneşte de la accepţia ca există materie vie acelulară (i.e.virusuri) şi materie vie structurată celular (i.e. organismele procariote şi eucariote).

Evaluarea apartenenţei taxonomice pentru materia vie are în vedere existenţa unor criterii morfologice şi fiziologice. Intre principalele *criterii morfologice* se menţionează: organizarea acelulară sau celulară (uni- sau multicelulară); structurarea genomului ş.a. Intre *criteriile fiziologice* se estimează: modalităţile principale de nutriţie (i.e. absorbtivă - la fungi; fotosintetică - la majoritatea plantelor; ingestivă - la animale); tipul de reproducere (replicaţie în cadrul "ciclului litic" sau al "ciclului lizogenic" - la virusuri; multiplicare prin diviziune amitotică şi mitotică - la celule) ş.a.

Problemele diversităţii morfofiziologice ale materiei vii are în vedere criteriile de organizare ale acesteia, distingându-se: materia vie cu organizare acelulară; material vie cu organizare celulară.

Materia vie cu organizare acelulară are drept formaţiuni reprezentative virusurile. Aceste entităţi ultrastructurale - diferenţiate cu ajutorul microscopiei electronice şi biochimiei - au ridicat numeroase probleme de ordin taxonomic, mult discutate în ştiinţele biologice şi medicale. Astfel, în opinia unor autori virusurile nu aparţin materiei vii, iar în

opinia altora (îndeosebi în ultimele două decenii) sunt considerate ca materie vie acelulară.

Pentru tratarea acestui subiect, în volumul de faţă, se are în vedere faptul că virusurile nu sunt organisme vii care pot fi incluse în regnuri specifice biologiei, dar reprezintă materia vie care se activează în anumite condiţii date şi oferă modele pentru diverse interacţii biochimice.

Virusurile sunt considerate ca paraziţi genetici ai unor celule-gazdă. Fiind lipsite de organizare celulară, virusurile nu se pot mobiliza şi nu pot avea metabolism propriu. Dezvoltarea şi reproducerea virusurilor are loc în celula-gazdă. Morfologic, virusurile se prezintă ca entităţi microscopice care au dimensiuni de 100-700 nm. Se poate discuta despre particularităţile morfofiziologice, despre topobiochimie şi despre organizarea genetică. Sub raport taxonomic virusurile au fost incluse în încrengătura Viro, ordinul Viridae. Materialul genetic viral (genomul viral) este constituit dintr-o singură moleculă de acid nucleic: acid deoxiribonucleic (ADN sau DNA) sau acid ribonucleic (ARN sau RNA).

Neavând ribosomi şi surse de energie, virusurile nu pot supravieţui decât în celule-gazda. Deci, prezintă parazitism obligatoriu. Virusurile pot infecta celula animală, vegetală sau bacteriană. Virusurile care infectează bacteriile sunt denumite bacteriofagi sau fagi.

Materia vie cu organizare celulară - în funcţie de complexitatea ultrastructurală a celulelor - a fost supusă unei clasificări ierarhizate, bazată pe regnuri.

In clasificarea organismelor vii, azi se consideră că "regnul" constituie categoria cea mai reprezentativă (Rawn, 1989). Pornind de la conceptul de regn, Whittaker (1969) propune gruparea vieţuitoarelor în cinci regnuri: Monera, Protista, Fungi, Plantae şi Animalia (fig.1-1).

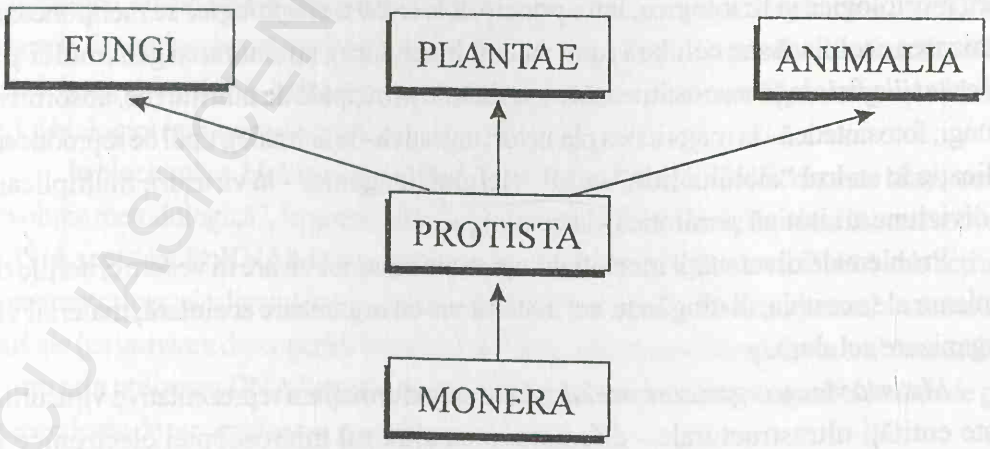


Fig. 1-1. Clasificarea organismelor vii în regnuri

BCU IASI/CENTRUL UNIVERSITAR LIBRARY

Această clasificare a organismelor vii are în vedere diverse criterii, e.g.:

a) organizarea structurii nucleare (recte a "aparatului genetic") deosebindu-se organisme pro- şi eucariote;

b) tipul de nutriţie, distingându-se organisme auto- şi heterotrofe;

c) celularitatea, organismele fiind uni- şi multicelulare.

O prezentare sinoptică a caracteristicilor generale ale regnurilor menţionate se redă în tabelul 1-1.

Tabel 1-1. Gruparea regnurilor în funcţie de caracteristicile biologice

Regnul	Caracteristici generale ale organismelor
Monera	Procariote. Autotrofe şi heterotrofe. Unicelulare: coloniale sau filamentoase
Prostita	Eucariote. Autotrofe şi heterotrofe. Unicelulare: coloniale sau filamentoase
Fungi	Eucariote. Heterotrofe. Multicelulare.
Plantae	Eucariote. Autotrofe. Multicelulare.
Animalia	Eucariote. Heterotrofe. Multicelulare.

Mai apropiată considerentelor de ordin didactic este clasificarea, devenită clasică, dată de Chatton (1925), care distinge organisme procariote şi eucariote. Aceasta se integrează regnurilor menţionate mai sus.

Procariotele. Aparţin regnului Monera şi includ arhebacteriile şi eubacteriile. La procariote nu se poate distinge un nucleu, considerent pentru care sunt denumite şi "organisme prenucleate". Din punct de vedere ultrastructural la celula procariotică se evidenţiază doar o "zonă nucleară" care conţine DNA strâns spiralat (asociat unor proteine histonice), constituind materialul genetic al celulei. Zona nucleară nu este circumscrisă de un înveliş perinuclear. Procesele de stocare ale informaţiei genetice se realizează la acest nivel.

Eucariotele. Sunt organisme cu ultrastructură celulară mai complexă. Acestea se includ în regnurile: Protista (organisme unicelulare), Fungi, Plantae şi Animalia (organisme multicelulare). Celulele eucariotice sunt "nucleate". Sub raport ultrastructural se disting nucleul, delimitat de un înveliş perinuclear şi organite celulare bine specializate. Materialul genetic de la nivel nuclear este organizat sub forma cromosomilor care conţin DNA, reprezentând cca. 95% din întregul conţinut de DNA celular.

La organismele procariote şi eucariote procesele de biosinteză şi biodegradare - reprezentând cele două laturi ale metabolismului (recte ana- şi catabolismul) - evidenţiază numeroase similitudini sub raportul căilor biochimice (biochemical pathways). Această observaţie prezintă relevanţă prin similitudinea detaliilor morfofiziologice, interesând ultrastructura celulelor procariotice şi eucariotice şi a particularităţilor topobiochimice, vizând localizarea bioconstituenţilor în aceste celule.

1.3. OBIECTUL DE STUDIU AL BIOLOGIEI MOLECULARE. INTERDISCIPLINARITATE

Progresele realizate în domeniul Biologiei moleculare au necesitat extinderea şi aprofundarea cunoştinţelor în domenii conexe (i.e. Biochimia, Microbiologia, Genetica, Fizico-chimia şi Fizica), cunoaşterea performanţelor specifice anumitor metode analitice şi, nu odată, depăşirea limitelor metodologice clasice.

Inter-şi multidisciplinaritatea în abordarea problemelor fundamentale şi aplicative din domeniul Biologiei moleculare este azi înţeleasă în alt context. Diviziunea didactică şi ştiinţifică în ştiinţele naturale, odată cu dezvoltarea biologiei moleculare, dobândeşte un cadru anacronic. Dacă totuşi persistă anumite limite ale disciplinarităţii, acestea au în vedere mai mult aspectele teoretice, metodologia experimentală, problematica fenomenologică, tehnica experimentală şi evident au un caracter mai mult didactic.

În prezent, în tot mai numeroase tratate de specialitate se includ capitole speciale, iar în cadrul enciclopediilor se includ volume separate care tratează problemele interdisciplinare şi aportul cercetărilor multidisciplinare la progresele realizate în ultimele decenii.

Acest principiu - vizând expunerea integrativă şi asociată, a noţiunilor inter- şi multidisciplinare - aplicat în domeniul biochimiei acizilor nucleici şi problemelor conexe de Biologie moleculară a fost uzitat şi în diverse tratate de Biochimie (Lehninger, 1980; Kruh, 1987; Rawn, 1989; Davidson şi Sittman, 1994; Stryer, 1996), de Biologie celulară şi Biologie moleculară (Sengbusch, 1979; Alberts et al., 1983; Darnell et al., 1986; Kaplan şi Delpech, 1990).

Conceptul de "biologie moleculară" este considerat azi antitetic pentru o separare a disciplinelor (Micklos şi Freyer, 1990), estimându-se că apariţia acestei ştiinţe este tributară confluenţei disciplinelor menţionate. Simplistă prin design, dar profundă prin inteligibilitate şi mesaj, este imaginea concepută de Lisa Shoemaker (1990) - prezentată de autorii mai sus citaţi, este redată şi în acest volum. (fig.1-2).

B.C.U. "M. EMINESCU" IAŞI

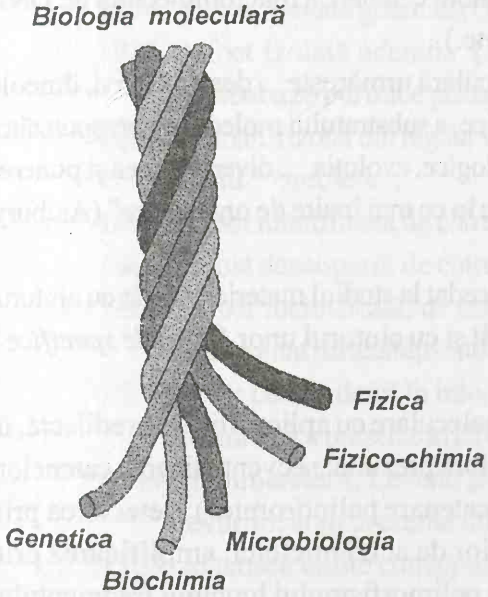


Fig. 1-2. Biologia moleculară ca "sinteză" a diverselor discipline (după Micklos şi Freyer,1 990)

Această imagine mimează "matisarea" ca expresie a interdisciplinarității în Biologia moleculară. Utilizăm termenul de "matisare" - specific ştiinţelor tehnice, termen a cărui acreditare s-a încercat pentru explicitarea structurilor de tranziţie la DNA cu dextrorotaţie (Wood, 1990; Gârban, 1992), dar care poate să descrie elocvent şi interdisciplinaritatea în ştiinţe (v.Cap.3).

Dacă vom încerca să aprofundăm puţin stările de fapte, vom putea constata că în "geneza" Biologiei moleculare există cinci discipline de bază: biochimia, microbiologia, genetica, fizica, fizico-chimia. La acestea se adaugă şi alte discipline importante pentru evoluţia, diversificarea şi aprofundarea cercetărilor.

În general, aportul biochimiei, al microbiologiei şi al geneticii sunt mai bine cunos-cute. Mai puţin cunoscut este aportul fizicii şi al fizico-chimiei în cercetările de acurateţe din domeniul biologiei moleculare. În acest cadru au fost utilizate unele metode specificefizicii, e.g.: difractometria cu raze X, spectrofotometria, fluorimetria, electroforeza pe suporturi solide etc. De asemenea, fizico-chimia (spre a utiliza asocierea terminologică specifică pentru limba engleză) şi-a adus un aport însemnat prin aplicaţiile analizei Fourier, a calculelor mecanic-cuantice, imple-mentarea metodelor radiochimice ş.a., în cercetările de acurateţe din domeniul biologiei moleculare.

La acestea, desigur, trebuie adăugată şi contribuţia virusologiei care a permis o evoluţie mai dinamică a cercetărilor asupra tehnologiei DNA recombinant, patologiei biochimice etc. Utilizarea conceptelor specifice virusologiei a contribuit la o disjuncţie a modului de tratare a problematicii în biologia celulară şi în biologia moleculară şi a impus formarea unui cadru mai circumscris pentru "Biologia moleculară".

Dacă ar trebui să justificăm aportul ştiinţelor exacte la fondarea şi evoluţia biologiei moleculare, o primă referire s-ar putea face la studiile din domeniul fizicii care au condus la conceptul de "biologie moleculară" (Astbury, 1950) şi la adaptarea metodelor specifice

cristalografiei la studiul structurii secundare dublu catenare a macromoleculei de DNA (Watson şi Crick, 1953; Wilkins et al., 1953 etc.).

In accepţia dată iniţial "biologia moleculară urmăreşte ... descoperirea, dincolo de manifestările ce au loc la scara biologiei clasice, a substratului molecular corespunzător ... cercetează în special formele moleculelor biologice, evoluţia, ... diversificarea şi punerea lor în valoare pe măsura trecerii la nivele din ce în ce mai înalte de organizare" (Astbury, 1950 - citat de Haggis et al., 1967).

In biologia moleculară modernă s-a procedat la studiul materiei vii atât cu ajutorul *"metodelor biochimice clasice"* (v.Cap.2), cât şi cu ajutorul unor *"metode specifice"* perfectate îndeosebi după anii '70 (v.Cap.6).

Dintre metodele specifice biologiei moleculare cu aplicabilitate, predilectă, în investigarea acizilor nucleici o importanţă majoră prezintă: secvenţializarea catenelor; hibridizarea (interesând implicit secvenţele catenare palindromice); detectarea prin sonde moleculare; determinarea fragmentelor de acizi nucleici; amplificarea prin reacţia în lanţ a polimerazei - PCR; evaluarea polimorfismului lungimii fragmentului de restricţie - RFLP ş.a.

1.4. REPERE ISTORICE GENERALE

Progresele în domeniul biologiei moleculare sunt indiscutabil legate de descoperirile efectuate în biochimia acizilor nucleici, interesând compoziţia chimică, relaţia structură chimică- activitate biologică, rolul macrobiomoleculelor de acizi nucleici în eredobiologie şi eredopatologie etc.Astfel, extinzându-se pe o perioadă de aproape un secol şi jumătate, au fost efectuate descoperiri asupra acizilor nucleici (i.e. acidul deoxiribonucleic - DNA) şi acidul ribonucleic - RNA) şi a precursorilor structurali ai acestora: mononucleotide, nucleozide, nucleobaze. În ultimele decenii ale secolului XX - îndeosebi după 1970 - se vorbeşte despre o revoluţie metodologică în domeniul Biochimiei şi Biologiei moleculare care au contribuit la impresionante progrese în domeniile biotehnologic, biomedical, patobiochimic etc.

Pornind de la aceste considerente se vor prezenta principalele descoperiri - de importanţă istorică - care au precedat progresele experimentale şi descoperiri care au contribuit direct la fundamentarea conceptelor şi aplicaţiilor biologiei moleculare.

1869 Miescher a izolat o nouă substanţă pe care a denumit-o "nucleină", decelată - în regnul animal - în nucleele extrase din celulele prezente în puroi;

1874 Au fost izolate guanina (G) şi hipoxantina (HX) de către Piccard;

1885 A fost izolată adenina (A) de către Kossel. Adenina şi guanina sunt nucleobaze purinice prezente în acizii nucleici (DNA şi RNA);

1889 Altman a izolat din regnul vegetal o substanţă complexă pe care a denumit-o "acid nucleic";

1893 A fost identificată de către Kossel şi Neuman, timina (T);

1900 A fost descoperit, de către Ascoli, uracilul (U);

1903 A fost identificată, de către Kossel şi Steudel, citozina (C). Izolarea a întâmpinat dificultăţi datorate dezaminării spontane a substanţei. Deci, se poate conchide că în intervalul 1893-1903, au fost izolate nucleobazele pirimidinice prezente în DNA - timina, citozina şi în RNA uracilul şi citozina;

1909 Hammarstern, Levene şi Jacobs au demonstrat că în acizii nucleici ai levurilor sunt prezente nucleobazele A, G, C, U şi ribozo-fosfat;

1909 Johansen emite conceptul de "genă" cu semnificaţia- acreditată la acea vreme - de unitate funcţională (minimală) a genomului;

1923-1929 Levene a demonstrat că acizii nucleici din timus sunt constituiţi din nucleobazele A, G, C, T şi deoxiribofosfat. De asemenea, a constatat că legătura glicozidică dintre pirimidină (nucleobaze pirimidinice) şi pentoză este de tipul N_1-C_1, fapt care a permis aprofundarea, în continuare, a particularităţilor structurale la acizii nucleici.

1930 Cercetările întreprinse în diverse laboratoare au permis stabilirea cu rigoare a diferenţelor existente între RNA şi DNA.

1941 Beadle şi Tatum au pus bazele geneticii moleculare, prin jalonarea rolului genelor în metabolismul proteinelor- mai exact în intuirea căilor bochimice ale biosintezei proteinelor.

1944 Avery et al. - au demonstrat, prin studii asupra pneumococilor, că suportul biochimic al transmiterii caracterelor ereditare este acidul deoxiribonucleic (DNA)

1947 Todd a constatat că legătura glicozidică dintre purină (nucleobaze purinice) şi riboză este de tipul N_9-$C_{1'}$. De asemenea, a observat că riboza este sub forma de anomer β cu notarea uzuală (β-Rib).

1950 Chargaff, în urma investigaţililor asupra mononucleotidelor din DNA de diverse provenienţe (microorganisme, ţesuturi vegetale şi animale), a constatat că există raporturile: A/T ~ 1; G/C ~ 1. Aceasta semnifică existenţa unor raporturi cvasiunitare.

1953 Watson şi Crick – bazându-se pe studii cristalografice asupra DNA efectuate în perioada 1949-1952 - au emis ipoteza structurii de "dublu helix" al macromoleculei de DNA, catenele poliheteronucleotidice fiind fixate prin legături de hidrogen între nucleobazele complementare (A=T şi G=C).

1968 Khorana a sintetizat prima genă artificială. Această realizare a contribuit la reconsiderarea conceptului de genă, asociind-o unei " entităţi biochimice". Astfel s-a deschis odată în plus calea spre abordarea problemei "genului genetic".

1972 Obţinerea primei molecule de DNA recombinant

1973 S-a publicat "moratoriul privind sistarea manipulărilor genetice în vitro" - conceput şi semnat de P.Berg, J.Watson ş.a. (în total, 11 personalităţi ale vieţii ştiinţifice internaţionale).

1974 Descoperirea metodei Southern - care permite vizualizarea directă a genelor, pornind de la un genom complex;

1975 Apariţia primei versiuni - contradictorie - reglementată prin edicte de către Institutul Naţional pentru Sănătate - NIH (Nationale Institute of Health) din S.U.A.;
Primul diagnostic prenatal prin analiza DNA (talasemia) elaborat prin utilizarea de sonde moleculare;

1977 Clonarea primei gene umane: lactogena placentară; ß- globina,
Prima localizare cromosomală a unei gene umane prin hibridizare moleculară (α-globina);

1978 Utilizarea, pentru prima dată, a metodei polimorfismul lungimii fragmentului de restricţie (RFLP) şi aplicarea la diagnosticul prenatal genotipic bazată şi pe metoda Southern (HbS),
S-a constituit prima " bancă genomică umană";

1979 Obţinerea primelor oligonucleotide sintetice utilizate ca sonde moleculare.

1980 Elaborarea primei propuneri privind o strategie generală de cartografiere a genomului uman prin metoda RFLP utilizând conceptele geneticii inverse (Botstein et al., 1980),
Clonarea şi secvenţializarea genelor pentru α- si β-interferon;

1981 Detectarea virusului hepatitei virale B (HVB) în serul sanguin uman prin hibridizare moleculară.

1982 Prima localizare cromosomală a locusului specific al unei boli necunoscute

(miopatia Duchenne pe cromosomul X p 21) prin linkage cu ajutorul metodei RFLP,

Producerea insulinei de uz uman (numită - humulină) prin manipulare genetică,

Obţinerea de şoareci transgenici gigantici - prin microinjectarea de somatotropină obţinută prin metode specifice biologiei moleculare;

1983 Prima localizare cromosomală - pe cromosomul 4 - a unui locus morbid autosomal în cazul unei gene necunoscute (coreea Huntington),

Secvenţializarea genomului pentru virusul care produce SIDA (Sindromul Imuno-Deficienţei Dobândite);

1984 Perfectarea metodei de macrocartografie de restricţie prin electroforeză în câmp pulsatil,

Clonarea şi secvenţializarea genei factorului anti-hemolitic VIII;

1985 Primul diagnostic prenatal al unei boli cu genă necunoscută cu ajutorul RFLP prezentând interes în eredopatologie (miopatia Duchenne);

Perfectarea metodei de amplificare electivă a DNA în vitro - denumită metoda PCR,

Localizarea pe gene a locusului morbid, pentru mucoviscidoză şi pentru policistoza renală;

1986 Producerea eritropoetinei prin metode specifice manipulării genetice,

Clonajul şi decriptarea unei noi gene morbide necunoscute (granulomatoza cronică);

1987 Clonajul şi decriptarea primei anti-oncogene (gena RB1 a retino-blastomului),

Producerea primului vaccin recombinat anti- HBV (deci împotriva hepatitei virale B),

Sistematizarea diverselor rezultate referitoare la localizarea cromosomală a unor boli genetice, e.g.: polipoza cronică familială; boala Alzheimer; neurofibromatoza periferică Recklinghausen; sindromul de cancer endocrin multiplu ş.a.

1988 Secvenţializarea distrofinei - proteină produsă de gena responsabilă de miopatia Duchenne.

Ultimul deceniu al secolului XX a fost caracterizat - în domeniul biologiei moleculare - de cercetări care au urmărit predilect aspecte aplicative. Astfel au fost extinse cercetările în domeniul biotehnologiilor, cu aspecte conexe producerii de medicamente,

de alimente etc. De asemenea au fost continuate şi aprofundate cercetările cu specific biomedical de la investigaţiile clinice, medico-legale până la problemele chimioterapiei. S-au extins cerectările asupra genomului diverselor organisme procariote şi eucariote, dar şi asupra genomului uman.

Cercetările aplicative au depăşit cadrul laboratoarelor din universităţi şi institute de cercetare şi au fost preluate de concerne naţionale sau chiar internaţionale.

1.5. ELEMENTE MORFOFIZIOLOGICE ŞI TOPOBIOCHIMICE SPECIFICE VIRUSURILOR

1.5.1. PRIVIRE SINOPTICĂ

Virusurile prezintă caracteristici morfofizologice diferite de toate microorganismele cunoscute. Dificultăţile de investigare (vizualizare, cultivare) ca şi anumite caractere discriminatorii (dimensiuni foarte mici, filtrabilitatea - considerată apanaj al exotoxinelor, parazitismul - obligatoriu intracelular, inactivarea termică ş.a.) au condus la numeroase erori în definirea conceptului de virus.

Conceptul de **virus** (lat. virus-lichid otrăvitor) - defineşte o entitate biologică acelulară, care sub raport morfologic este constituită din regiuni distincte. Iniţial, descriptiv, au fost menţionate regiunile: *formaţiunea capitală* - cvasisferică sau poliedrică (în care este localizat şi materialul genetic); *formaţiunea centrală* - cu aspect cilindric, prezentând similitudini cu două tuburi coaxiale; *formaţiunea terminală* - constituită din placa terminală şi fibrele terminale.

In definirea conceptului de virus s-a acreditat ideea că virusurile sunt agenţi infecţioţi de tip "special", iar infecţia virala este consecinţa introducerii materialului genetic viral în celula-gazda.

Deşi unele boli virale la om şi animale erau cunoscute din antichitate (e.g.: rabia, variola), iar la plante din secolul XVIII (e.g.: boala mozaicului ponesat la lalele), problema stabilirii agenţilor infecţioşi şi a unor mijloace terapeutice a rămas mult timp insurmontabilă. Mai mult, în 1796 Edward Jenner efectuează primele vaccinări antivariolice. Această etapă "aplicativă" nu a putut fi completată cu informaţii "teoretice" (fundamentale) asupra agentului infecţios.

Un moment important în constituirea Virusologiei ca ştiinţă, a fost acela al demonstrării posibilităţii de transmitere a bolii mozaicului tutunului şi a inactivării principiului

infecţios (Mayer, 1886), precum şi a confirmării infecţiozităţii, prin multiplicarea agentului patogen din sucul provenit de la plante de tutun bolnave şi introducerea acestuia în plante sănătoase (Ivanovski, 1892). Aceste date au atestat existenţa virusului mozaicului tutunului (VMT). Ulterior au fost comunicate şi date asupra agentului etiologic al febrei aftoase (Löffler şi Frosch, 1897) şi aceasta dovedindu-se de natura virală.

Perioada care a urmat a condus la dezvoltarea Virusologiei, la extinderea şi aprofundarea cunoştinţelor asupra morfologiei, topobiochimiei, patogeniei virusurilor (Luria şi Darnell, 1967; Luria, 1973; Nayak, 1978; Levy et al., 1994).

Parazitismul virusurilor este condiţionat, fiind bazat pe aportul de materie şi energie rezultate din metabolismul material (glucidic, lipidic, protidic, hidro-electrolitic) şi a metabolismului energetic din celula-gazdă. Se remarcă faptul că la virusuri există un *"parazitism absolut"*, discriminator faţă de bacterii la care sxistă un metabolism material şi energetic propriu.

Pentru definirea acestuia Lwoff (1981) foloseşte noţiunile de biosinteză şi diataxie. Prin biosinteză - se defineşte producerea metaboliţilor celulari necesari structurilor virale, iar prin diataxie - se defineşte organizarea secvenţelor specifice materialului genetic viral. In accepţia acestor formulări se remarcă faptul că prin diataxie se realizează competiţia dintre virus şi celula-gazdă. O activare a diataxiei virale implică formarea genomului viral şi apariţia virusului nou. Deci, se poate afirma că replicarea virusurilor este condiţionată de activarea diataxiei virale şi inhibarea diataxiei celulare.

1.5.2. ULTRASTRUCTURA SI TOPOBIOCHIMIA VIRUSURILOR

Virusurile, neavând caractersitici ultrstructurale specifice celulelor, sunt lipsite de un metabolism propriu. Aceste aspecte - detailate mai sus justifică faptul că virusurile sunt considerate ca *"paraziţi genetici"* care, pentru reproducere, utilizează aparatul genetic al unor celule-gazdă.

Atributele amintite au condus la acreditarea concepţiei că virusurile nu sunt organisme vii şi nu au fost incluse în cele cinci regnuri (Purves şi Orians, 1987; Rawn, 1989). Cu toate acestea studiile efectuate asupra virusurilor au furnizat "modele" pentru anumite procese care au loc în organismele vii. Mai mult, studiile asupra morfologiei şi a relaţiei structura chimică - activitate biologică au condus la acreditarea unor termeni ca "genetica virusurilor", "genomul viral" ş.a. De asemenea, au fost modelate procese care prezintă similitudine cu organismele vii, îndeosebi în domeniul morfogenezei. Autoreplicaţia virală şi acţiunea

virusurilor asupra bacteriilor, au condus la elaborarea unui model pentru reglarea genetică.

Cu toate acestea nu este pe deplin acreditată ideea apartenenţei virusurilor de lumea vie. In acest context se menţionează că şcoala românească de virusologie medicală - coordonată de o eminentă personalitate a virusologiei internaţionale, distinsul acad. N.Cajal - consideră virusurile "drept cea mai simplă materie înzestrată cu viaţă" (Cajal, 1990).

Sub raport ultrastructural şi topobiochimic virusul este format dintr-un număr relativ redus de gene cu conţinut bine definit (DNA sau RNA). In jurul genelor se afla o manta protidică, care constituie capsida. La virusurile mai simple aceasta este formată dintr-un singur tip de proteină, iar la virusurile complexe din câteva tipuri de proteine diferite. De asemenea, virusurile complexe sunt înconjurate cu un înveliş membranar, cunoscut sub numele de peplos.

Virusurile au dimensiuni foarte reduse, fiind vizibile doar la microscopul electronic şi sunt filtrabile (asemănător toxinelor), fapt care face distincţia netă între virusuri şi bacterii.

Cu referire la virusuri se impune menţionarea unor atribute morfofiziologice care permit o delimitare a nominalizării formaţiunilor: e.g.: virion, virus, provirus. În accepţia cunoştinţelor actuale se pot defini:

- virionul - unitate morfo-funcţională primară care dispune de capacitate infectantă
- virusul - formaţiune genomică virală liberă în celula-gazdă cu posibilităţi de replicaţie
- provirusul - formaţiune genomică virală integrată cromosomului din celula-gazdă

Aceste delimitări pot fi considerate, in facto, ca posibile "stări interactive" în relaţia dintre virus şi celula-gazdă.

Virusurile au unele proprietăţi asemănătoare celulelor, e.g.: autoreproducerea, ereditatea, variabilitatea ş.a. Existenţa virusurilor însă este dependentă de celula-gazdă (procariotică sau eucariotică), motiv pentru care sunt consideraţi paraziţi obligatorii.

Astfel, din ansamblul virion/celulă-gazdă se realizează activarea virionului cu perspectiva biogenezei formaţiunii genomice virale, prin tranziţia de la virion la virus (Cartledge, 1992).

În acest context se impune şi explicitarea noţiunii de *transfecţie*. Transfecţia a fost definită ca infecţie celulară directă, realizată de către acidul nucleic viral (DNA sau RNA) în urma decapsidării virionului şi ejectării acidului nucleic din core şi injectării în viitoarea celulă-gazdă procariotică sau eucariotică.

Studiul transfecţiei s-a făcut îndeosebi în sistemul virion / celulă-gazdă bacteriană, fiind descrise mai multe tipuri interactive, e.g.: tipul bacteriofag λ (DNA) / celula-gazdă E coli; tipul bacteriofag M-12 (RNA) / celulă-gazdă E. coli; tipul bacteriofag ϕX174 (DNA) / celula-gazdă E. coli.

De asemenea, a fost studiat un tip de transfecţie mediată de ioni de Ca^{2+}, utilizat în special pentru experimentele privind tehnologia DNA recombinant, e.g.: în cazul bacteriofag λ (DNA) / celulă-gazdă E. coli; bacteriofag P2 (DNA) / celulă-gazdă E.coli.

Din punct de vedere ultrastructural şi topobiochimic virusurile - aşa cum s-au descris - sunt ansambluri moleculare în care s-au decelat proteine şi acizi nucleici: RNA- la ribovirusuri şi DNA - la deoxiribovirusuri. Se exemplifică unele date privind compoziţia ribovirusului bacterian (bacteriofagului) R17. Acesta este considerat a fi cel mai mic virus care este format din trei macromolecule: proteina de înveliş - formată din 180 de resturi moleculare cu masa totală de 13.750 Da; proteina de constituţie internă (numită şi "proteina A") - cu masa moleculară de 39.900 Da; acidul ribonucleic (RNA) cu masa de 1.100.000 Da (Callaghan et al., 1973).

1.5.2.1. Segmentul capital

In virioni - forme precursoare ale virusurilor- se disting, în general, aceleaşi regiuni, numite uzual: *segment capital* sau *cap* (engl. head; fr. tête), *segment caudal* sau *coadă* (engl. tail; fr. queue). O prezentare schematică a morfologiei virionilor este redată în fig.1-3. Sub raport topobiochimic, în funcţie de compoziţia de acizi nucleici dispuşi în segmentul capital, se disting două tipuri de virioni, i.e.: deoxiribovirioni - în care este prezent DNA; ribovirioni - în care este prezent RNA.

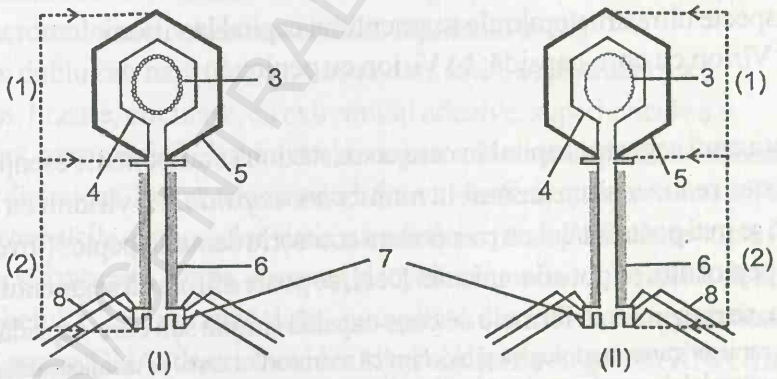


Fig. 1-3. Ultrastructura virionilor -prezentare schematică (detalii în text).
(I) tip deoxiribovirion; (II) tip ribovirion;
1) segment capital; 2) segment caudal; 3) core; 4) capsidă; 5) peplos;
6) cilindrul axial; 7) placă bazală; 8) fibre caudale

Reprezentarea schematică a ultrastructurii virionilor (v.fig.1-3) este caracteristică pentru viruşii bacteriilor (bacteriofagi). Există numeroşi viruşi care sub aspect morfologic - studiaţi la microscopul electronic - relevă caracteristici diverse. Astfel, au fost descrise forme: *sferice, e.g.:* v. gripal; *cilindrice,* e.g.: v.mozaicului tutunului, bacteriofagi; *paralelipipedice,* e.g.:v. variolei; *filamentoase,* e.g.:v. Marburg, v.Ebola; *sferice cu prelungiri caudale,* e.g.: bacteriofagi etc. (Fields şi Knipe, 1990; Cajal, 1990).

Cu referire la ultrastructura virionilor, în unele tratate de specialitate, se face remarca faptului că *segmentul capital* este constituit din "core" ("corp central" sau "miez central") şi din "capsidă" . În core se află genele care conţin acidul nucleic, i.e.: DNA sau RNA. Aşa cum s-a arătat, virusurile mai complexe prezintă şi un înveliş - peplosul.

În continuare se află *segmentul caudal* constituit din: *cilindrul axial, placa bazală* şi *fibre caudale*. Prin mijlocirea segmentului caudal se realizează contactul cu celula-gazdă.

Revenind asupra segmentului capital se menţionează că acesta este integrat morfofiziologic şi dotat cu proprietatea de infecţiozitate (fig. 1-4). Ultrastructura virionilor

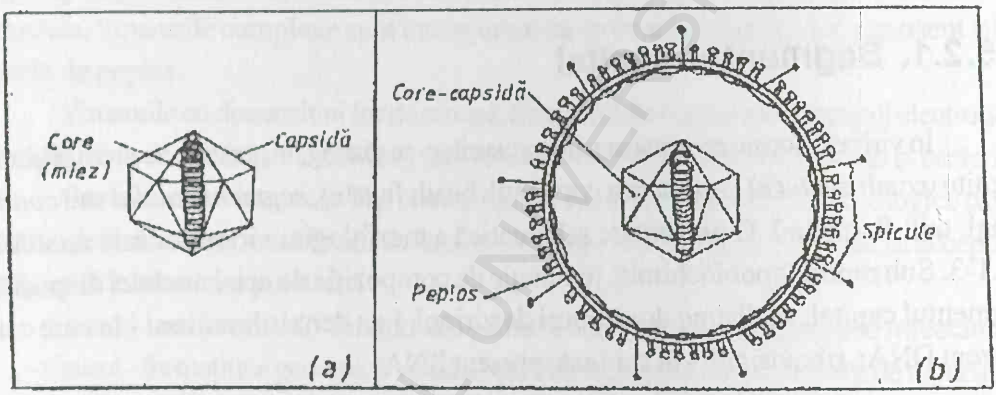


Fig. 1-4. Aspecte ultrastructurale ale segmentului capital la virioni
a) Virion cu core-capsidă; b) Virion cu peplos

relevă prezenţa unui segment capital în care coexistă două componente esenţiale: *core şi capsida*. Acestea realizează un ansamblu numit *core-capsidă*. La virionii cu organizare mai complexă se mai poate întâlni un component accesoriu denumit peplos (înveliş extern). La exteriorul peplosului se pot afla spicule. Deci, se poate afirma că segmentul capital, în ansamblul său, se prezintă sub formele de core-capsidă simplă sau core-capsidă peplosată.

Pentru caracterizarea morfologică şi biochimică a virusurilor uzual se menţionează: dimensiunile lineare ale acizilor nucleici - exprimate de obicei în microni sau micrometri; masa moleculară - exprimată în Da; numărul de perechi de baze exprimat în kilobaze - kb (de fapt acest mod de scriere general acceptat defineşte perechile de nucleobaze, dar pentru simplificare se utilizează noţiunea de "baze"). Uneori exprimarea se face în perechi de baze - pb. In scrierea curentă se are în vedere corespondenţa: 1000 pb corespund la 1kb la DNA şi 1000 b corespund la 1 kb la RNA.

Moleculele de acizi nucleici diferă mult de la un virus la altul. Spre exemplu, DNA la bacteriofagul λ are mărimea de 17 μm şi cca 47.000 pb, iar DNA la bacteriofagii T2 şi T3 are 56 μm şi cca 200.000 pb.

In continuare se vor descrie diversele segmente ultrastructurale, definitorii pentru virioni şi virusuri. Descrierea acestor segmente oferă o imagine de ansamblu asupra caracteristicilor morfofiziologice şi topobiochimice ale virusurilor.

1.5.2.1.1. Core

În segmentul capital, aşa cum s-a arătat, se disting trei entităţi ultrastructurale: core, capsida şi peplosul. Dintre acestea în interior se află dispus, aşa numitul *"core"*, *"corp central"* sau *"miez central"* (engl. *"central core"* - după denumirea folosită de Purves şi Orians, 1987).

Acidul nucleic prezent în "core" - în accepţia utilizării acestei denumiri - convenim a-l numi *"acid nucleic coreal"*. Deci, în funcţie de natura acizilor nucleici poate exista *DNA coreal*, respectiv *RNA coreal*. Acidul nucleic coreal este înconjurat de masă redusă de proteine denumite "proteine interne". Se estimează că aceste proteine contribuie la menţinerea stării condensate a acidului nucleic.

In corpul central se află materialul genetic viral, reprezentat prin acidul nucleic coreal de mărime redusă în care se stochează informaţia genetică. Astfel este constituit genomul viral (v.Cap.5).

Genomul viral prezintă caracteristici discriminatorii în raport cu genomul celulelor procariotice (în care se află genofori) şi genomul celulelor eucariotice (în care se află cromosomi). Caracteristici discriminatorii vizează, în principal, macromoleculele de acizi nucleici, luându-se în considerare:

- natura acestora: DNA sau RNA;
- dimensiunile acestora: număr de nucleotide, exprimat adesea în kb (kilobaze);
- masa macromoleculei: masa moleculară exprimată în Da;
- structura: dublu catenară (dc), monocatenară (mc), segmentată ş.a.;
- topologia: lineare, circulare, cu extremităţi adezive, superhelicale ş.a.

Evident, caracteristicile discriminatorii majore sunt compoziţia în nucleobaze şi secventa nucleotidelor din catene. Dar aceste caracteristici sunt întâlnite şi la cromosomii celulari.

Caracteristicile genoamelor virale sunt definite prin aşa numitele "tipuri de genom" care sunt caracterizate prin natura, structura şi topologia macromoleculelor de acizi nucleici coreali. In tabelul 1-2 se prezintă date - compilate din tratate de specialitate - privind virusurile cu genom DNA (deoxiribovirusuri) şi virusurile cu genom RNA (ribovirusuri)

În afară de structurile genomice dublu catenare (dc) şi monocatenare (mc) s-a mai descris structura de "genom segmentat". Cu referire la aceasta se consideră că prezintă avantajul de-a putea forma genoame noi printr-un proces de "pseudorecombinare", mărind astfel viabilitatea virusurilor şi opunând rezistenţă celulei-gazdă (Gibbs şi Harrison, 1976; Levy et al., 1994).

In definirea genomului viral se mai estimează numărul de gene şi masa moleculară a acizilor nucleici. S-a constatat că numărul de gene variază foarte mult, e.g.: 3 gene (la virusul Polyoma), 160 gene (la Poxvirus). De asemenea, masa moleculară prezintă variaţii de la 1,2 -1,8 · 10^6 Da (la Parvovirusuri) până la 200 · 10^6 Da (la virusul Pox).

Tabel 1-2. Caracteristici generale ale unor genoame virale

Tipul de genom			Exemple
Natura	*Structura*	*Topologia*	
DNA	monocatenar	linear circular	Parvovirus
	dublu catenar	linear deschis	fag ϕ X 174 fag T7
		linear închis	Poxvirus
		circular închis (superhelical)	Papoavirus
		cu redundenţă terminală	Adenovirus
		cu extremităţi monocatenare adezive	fag
RNA	monocatener	linear	VMT
		pliat	fag R 17
		circular	virusul encefalopatiei la şoarece
	dublu catenar	linear	Reovirus

1.5.2.1.2. Capsida

In structura *capsidei* (gr. kapsa-cutie; meros-parte) se află un lanţ polipeptidic sau un agregat de lanţuri polipeptidice diferite sau identice, determinând o anumită simetrie.

Alături de genom, capsida virală concură la formarea ansamblului *core-capsidă*, care defineşte ultrastructura virală.

Investigaţiile electronomicroscopice au condus la decelarea unor subunităţi morfologice numite *capsomere*. Acestea diferă ca mărime şi formă de la un virus la altul. Numărul capsomerelor, structura şi compoziţia acestora sunt de fapt controlate de informaţia genetică, realizându-se simetrii virale diverse, e.g.: helicală; icosaedrică etc.

La *virusurile helicale* capsomerele sunt formate dintr-o singură moleculă proteică, iar la *virusurile icosaedrice* din 5-6 molecule proteice. proteinele din capsidă au masa moleculară variabilă de la 12.000 - 110.000 Da şi sunt denumite cu un termen generic *proteine capsidale.*

În cazul virusurilor mai complexe sub raport morfofuncţional, s-au decelat proteine şi în interiorul capsidei. Acestea sunt asociate proteinelor interne din corpul central. Structura şi rolul acestora nu este cunoscut. Morfologic se constituie ansamblul integrat care conţine core (corpul central) şi capsida, ansamblu care, aşa cum s-a arătat, este denumit cu un termen generic *"core-capsida"*.

Sub raport topobiochimic virusurile nu posedă un echipament enzimatic adecvat proceselor metabolice şi bioenergetice pentru autoreproducere şi autodezvoltare. Totuşi

au fost descoperite *enzime virale*. Dintre acestea prima izolată a fost neuramidaza (Hirst, 1942) din virusul gripei (i.e. influenţa), supozându-se că ar proveni din celulele-gazdă. Această enzimă se pare că este extrem de importantă în asigurarea patogenităţii virale, prin diverse mecanisme, e.g.: îndepărtarea acidului N-acetilmuramic de pe receptorii membranari celulari pentru a asigura penetrarea virusului; înlăturarea acidului sialic de pe învelişul extern al virionilor împiedicând agregarea acestora, efect antiagregant care creşte infectivitatea virală. Ipoteza codificării enzimei de către gene virale a fost dovedită după aprofundate studii experimentale (Dreniek, 1972).

In afară de neuramidază, s-au mai decelat: endo- şi exonucleaze, nucleotidfosfohidraze, RNA-polimeraza (transcriptaza), DNA-polimeraza-RNA dependentă (reverstranscriptaza sau transcriptaza inversă) ş.a. Pentru o abordare corectă şi complexă, problemele enzimologiei virale se studiază în cadrul conex al relaţiei dintre virus şi celula-gazdă, recte în cadrul proceselor de patogeneză.

Acest mod de studiere este important pentru considerentul că replicaţia virusurilor (care constă în producerea de noi copii ale genomului viral urmată de încapsidare şi ulterior formarea unui virus progen) este condiţionată de procese metabolice, bioenergetice şi informaţionale comunitare, interesând atât virusul cât şi celula-gazdă.

1.5.2.1.3. Peplosul

Învelişul extern al virusurilor, cunoscut şi sub numele de peplos (gr.peplos-manta), întâlnit doar la anumite tipuri de virusuri - acoperă şi protejează core-capsida. Rolul peplosului se relevă cu pregnanţă în păstrarea stabilităţii core-capsidei şi în facilitarea fixării virionului pe celula-gazdă. In acest mod se asigură o patogenitate crescută.

Există virusuri peplosate (cu înveliş extern) şi virusuri non-peplosate (lipsite de acest înveliş) denumite din acest considerent şi "virusuri nude".

Sub raportul ultrastructurii şi compoziţiei chimice peplosul este un înveliş lipoproteic caracteristic virusurilor, care se maturizeaza în cursul "înmuguririi" virionului în membrana celulară (e.g.: Ortomyxovirus, Paramyxovirus, Rhabdovirus, Carnavirus ş.a.) şi, în puţine cazuri, în cursul "înmuguririi" în membrana perinucleară eucariotică (e.g.: Herpesvirus) sau în alte condiţii. In general se poate afirma ca modul de formare al peplosului nu este pe deplin cunoscut.

Electronomicroscopic s-au aprofundat investigaţiile asupra peplosului constatându-se că stratul dublu lipidic este acoperit de exterior cu glicoproteine, iar la interior - în unele cazuri - este tapetat cu *polipeptide*.

Glicoproteidele sunt formate dintr-o catenă polipeptidică pe care se pot lega lateral resturi glucidice, care conţin manoză, galactoză, fructoză, N-acetilglucozamină,

acid muranic etc. Masa moleculară a glicoproteinelor este de $10 \cdot 10^3 - 100 \cdot 10^3$ Da (din care glucidele reprezintă 5-40%).

Pe învelişul extern al peplosului se mai pot afla microformaţiuni aciculare denumite *spicule*, care au compoziţie asemănătoare glicoproteinelor virale cu dispoziţie subjacentă. Aceste microformaţiuni pot fi îndepărtate de enzime proteolitice (e.g.: neuramidaza) sau de hemaglutinine. Astfel de studii au fost efectuate pe Ortomyxovirus, Myxovirus, observându-se efectul proteolitic" "denudant" pentru spicule. Este posibil ca acest fapt să fie important pentru patogeneză.

Polipeptidele din interiorul peplosului se dispun între stratul dublu lipidic al acestuia şi se pare că are rol protector pentru formaţiunile core-capsidale. S-a presupus că aceste polipeptide aparţin core-capsidei, dar prin studii asupra ultrastructurii (fracţionarea ultracentrifugală, microscopie electronică ş.a.) s-a constatat că acestea aparţin peplosului.

1.5.2.2. Segmentul caudal

Segmentul caudal, numit curent "coadă" (engl. tail; fr. queue), prezintă trei entităţi cu particularităţi morfofiziologice distincte: *cilindrul axial*; *placa bazală* şi *fibrele caudale*. Diverse date asupra ultrastucturii acestora se prezintă în continuare.

1.5.2.2.1. Cilindrul axial

Prima parte a segmentului caudal este reprezentată de aşa numitul "corp central al cozii" sau "cilindrul axial" (Zarnea, 1983). În literatura de specialitate există diverse reprezentări schematice ale acestei formaţiuni şi figurează cu denumiri diferite, neexistând un termen general acreditat (Darnell et al., 1986; Purves şi Orians, 1987; Fields şi Knipe, 1990 etc.).

Aspectul general al cilindrului axial permite compararea cu două tuburi coaxiale. Ansamblul acestora relevă prezenţa unei feţe exterioare în contact cu mediul ambiant şi a unei feţe interne care comunică cu segmentul capital (v. fig. 1-2).

Particularitatea morfologică descrisă permite tranzitarea cilindrului axial de către acidul nucleic coreal (DNA sau RNA) care este "ejectat" din segmentul capital (mai exact din core) spre placa bazală şi "injectat" prin membrana celulară procariotică sau eucariotică, în momentul transfecţiei.

Caracteristicile ultrastructurale ale cilindrului axial se întâlnesc la virusurile temperate şi virulente. Prin intermediul acestei formaţiuni, care dispune şi de un sistem contractil, acidul nucleic coreal este injectat în bacteria devenită celulă-gazdă. În urma injectării are loc decapsidarea virusului urmată de liza membranei cleulare şi apoi - în funcţie de natura virusului - se va produce lizogenia sau liza celulei gazdă (v.Cap.1.5.3.).

1.5.2.2.2. Placa bazală

Sub aspect morfofiziologic placa bazală (engl. tail plate or base plate; fr. plaque basale) reprezintă componenta structurală necesară fixării fibrelor caudale la suprafața membranei celulare (pro- sau eucariotice) a viitoarei celule-gazdă.

În condițiile interacțiunii dintre virus și celula-gazdă, placa bazală după "atașare" pe membrana celulară este angajată în facilitarea traversării acidului nucleic coreal (DNA sau RNA) prin "ejectarea" acestuia din core și "injectarea" în viitoarea celulă-gazdă. În acest mod se realizează procesul de transfecție.

In fig. 1-5 se prezintă, schematic, acțiunea bacteriofagului T4 asupra celulei de Escherichia coli. In acest sens se redau - stadializat - diversele "etape interactive" în relația dintre virus (i.e.: bacteriofagul T4) și celula-gazdă procariotă (i.e.: celula bacteriei E. coli). În realizarea

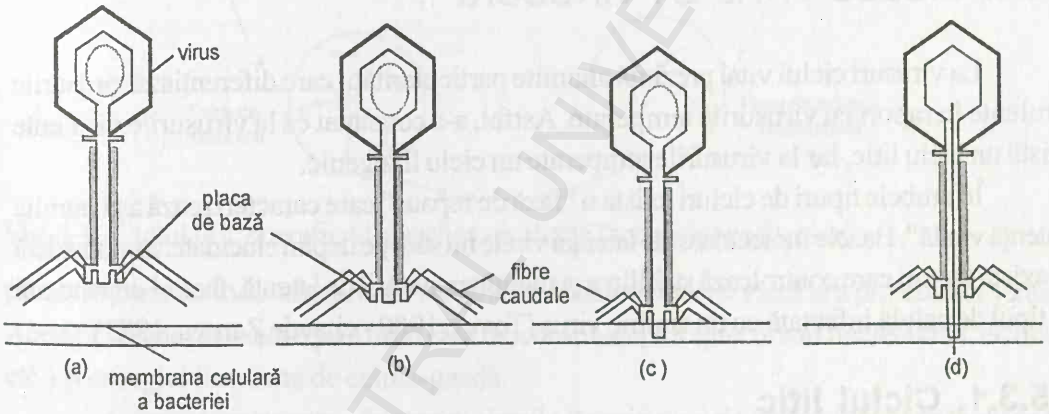


Fig. 1-5. Etapele interactive în relația dintre virus și celula-gazdă în cazul bacteriei (detalii în text)

etapelor interactive - care stau la baza transfecției - un rol esențial au segmentul capital și segmentul caudal. Prin intermediul plăcii bazale are loc fixarea la membrana celulei-gazdă.

15.2.2.3. Fibrele caudale

În interacțiunea dintre virus și viitoarea celulă-gazdă există o etapă precursoare, în care prin intermediul fibrelor caudale (engl. tail fibers; fr. fibres terminales ou fibres) are loc atașarea virionului la membrana celulară.

Contactarea se face, inițial prin intermediul fibrelor terminale și ulterior prin placa bazală. După aceste etape se produce penetrarea membranei celulare, iar ulterior are loc injectarea acidului nucleic coreal.

Stadializarea în procesul de transfecţie - iniţiat de mişcare fibrelor caudale - se poate prezenta sumar prin succesiunea următoarelor etape:

a) prezenţa virionului în proximitatea membranei bacteriene, i.e. a viitoarei celulă-gazdă;
b) ataşarea virionului la membrana celulară prin intermediul fibrelor caudale;
c) contactarea la nivelul plăcii bazale urmată de penetrarea treptată a membranei celulare;
d) ejectarea acidului nucleic coreal din segmentul capital şi injectarea în celula-gazdă urmată de activarea virionului.

Procesul de transfecţie - în totalitatea sa - se realizează prin injectarea acidului nucleic coreal în celula-gazdă. În final, resturile virionului (formaţiunile capitală şi centrală) dezactivate, se vor autodistruge. Acest proces este cunoscut sub denumirea de *"decapsidarea"* virionului.

1.5.3. CICLUL VITAL LA VIRUSURI

La virusuri ciclul vital prezintă anumite particularităţi, care diferenţiază virusurile virulente în raport cu virusurile temperate. Astfel, s-a constatat că la virusurile virulente există un ciclu litic, iar la virusurile temperate un ciclu lizogenic.

În ambele tipuri de cicluri există o "fază de repaus" care caracterizează aşa numita "latenţă virală". Bazele moleculare ale latenţei virale nu sunt pe deplin elucidate. Se consideră că există factori care controlează stabilirea şi menţinerea stării de latenţă, factori dependenţi de tipul de celulă infectată cu un anume virus (Tovey, 1980 - citat de Zarnea, 1983).

1.5.3.1. Ciclul litic

Virusurile *virulente* prezintă un ciclu de viaţă numit **"ciclu litic"**. Acest ciclu este definit prin existenţa a cinci faze (fig.1-6) cu caracteristici discriminatorii:

a) *faza de repaus* - în care virusul (bacteriofagul) matur se află în afara celulei-gazdă (procariotică sau eucariotică).

b) *faza de absorbţie - infectare* - virusul este reţinut prin intermediul segmentului caudal (placa şi fibrele) la suprafaţa viitoarei celule-gazdă. Apoi, are loc ejectarea acidului nucleic coreal din formaţiunea capitală a virusului spre celula-gazdă. După pătrunderea acestuia în celulă are loc descompunerea DNA din celula-gazdă. Procesul se desfăşoară sub acţiunea enzimei deoxiribonucleaza, sintetizată ca urmare a acţiunii mRNA viral.

c) *faza de eclipsă sau faza vegetativă* - se produce prin pierderea treptată a capacităţii de infecţie a virusului. Molecula de acid nucleic participă la biosinteza unor

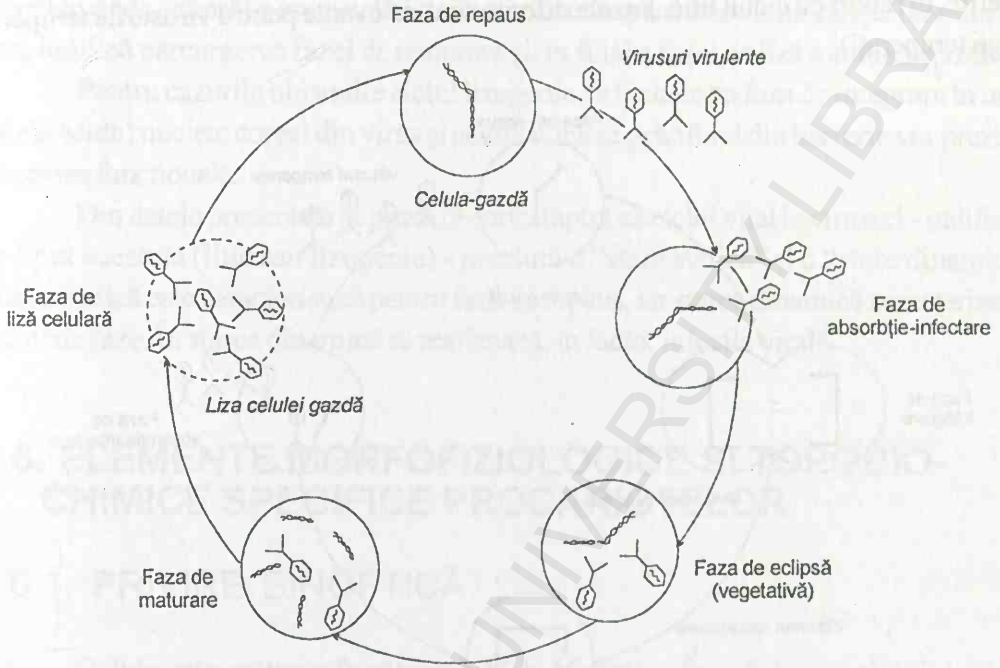


Fig. 1-6. Ciclul litic specific virusurilor virulente (succesiunea fazelor)

proteine-enzime. In continuare are loc sinteza acizilor nucleici virali şi a proteinelor virale. Acest proces se realizează prin utilizarea bioconstituenţilor (precursori nucleotidici, enzime etc.) şi energiei furnizate de celula-gazdă.

d) *faza de maturare* - în care molecula de acid nucleic coreal (viral) se include în capsida proteică virală. Astfel - uzitând de terminologia cu care operează Virusologia - se poate afirma că în faza de maturare are loc încapsidarea genomului viral. In acest mod se formează ansamblul core-capsidă şi în final noile particule virale.

e) *faza de liză* - se evidenţiază distrugerea (liza) celulei-gazdă şi eliberarea noilor particule virale.

În cadrul acestor faze are loc transferul de acid nucleic de la virus la celulă (procariotică, eucariotică), urmat de încapsidarea genomului viral. În final are loc liza celulei - gazdă. După aceasta ciclul litic se poate relua.

1.5.3.2. Ciclul lizogenic

La virusurile *temperate*, ciclul vital prezintă alte caracteristici şi este cunoscut sub denumirea de **"ciclu lizogenic"**. Acest ciclu prezintă patru faze cu unele diferenţe

notabile (fig.1-7). Se poate afirma că în cazul ciclului lizogenic există faze identice şi faze diferite, în raport cu ciclul litic. Fazele diferite sunt relevante pentru virusurile temperate (fagii temperaţi).

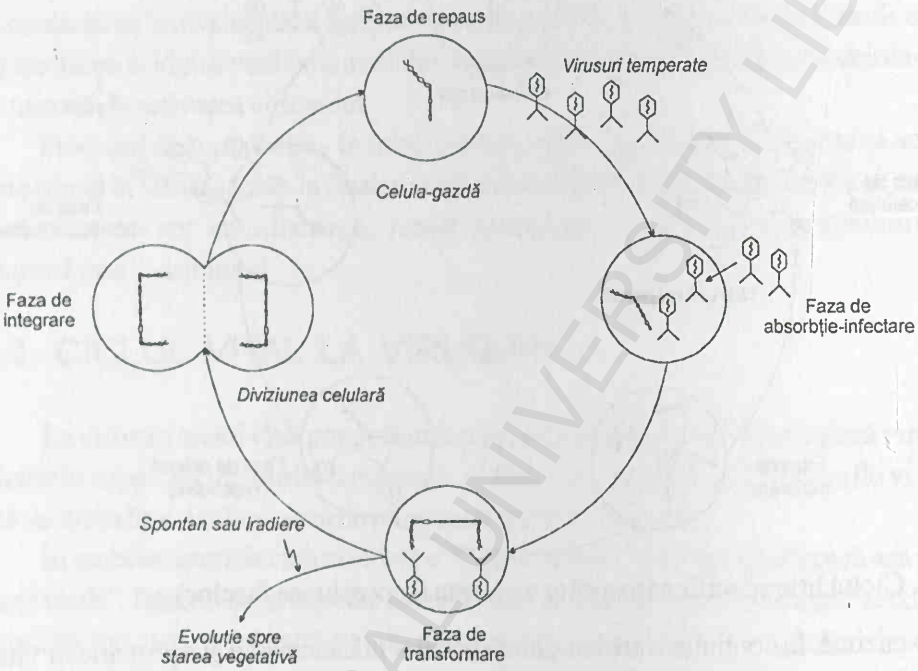


Fig. 1-7. Ciclul lizogenic specific virusurilor temperate (succesiunea fazelor)

a) *faza de repaus* - prezintă similitudini cu prima fază din ciclul litic. Deci, faza este caracterizată prin prezenţa virusului (bacteriofagului) matur în afara celulei gazdă.

b) *faza de absorbţie - infectare* - în ansamblul său prezintă aceleaşi caracteristici ca şi în cazul ciclului litic. Elemente relevante pentru ciclul lizogenic apar după infectare.

c) *faza de transformare* - caracterizată prin faptul că acidul nucleic viral se integrează genoforului bacterian (v.Cap.1.6.2) cu care se replică sincronizat. In această ipostază molecula de acid nucleic coreal (viral), i.e. DNA sau RNA este "fixată" în genoforul bacterian şi constituie astfel un provirus (profag).

d) *faza de integrare* - se defineşte prin transformarea particulei virale în provirus, prin fixarea acidului nucleic coreal în genoforul bacterian cu care se divide sincron.

In ciclul lizogenic pot însă să apară şi modificări. Astfel, spontan (la cca.10.000 diviziuni ale bacteriei lizogene) sau prin iradiere, provirusul poate fi eliberat din genoforul bacterian şi devine "virus vegetativ".

BCU "LUCIAN BLAGA" UNIVERSITY LIBRARY

Această nouă formă - sub raport funcțional - va avea specificul activității din faza vegetativă (de eclipsă) a unui ciclu litic. In continuare particula virală începe un ciclu litic care implică parcurgerea fazei de maturare și, în final a fazei de liză a celulei-gazdă.

Pentru cazurile obișnuite ciclul lizogenic se încheie cu faza de integrare în urma căreia acidul nucleic coreal din virus și acidul nucleic genoforal din bacterie vor prezenta sincronie funcțională.

Din datele prezentate se poate observa faptul că ciclul vital la virusuri - indiferent de tipul acestuia (litic sau lizogenic) - prezintă o "stare statică" și o "stare dinamică". Starea statică este caracteristică pentru faza de repaus, iar starea dinamică caracterizează restul de faze. În starea dinamică se realizează, in facto, infecția virală.

1.6. ELEMENTE MORFOFIZIOLOGICE SI TOPOBIO-CHIMICE SPECIFICE PROCARIOTELOR

1.6.1. PRIVIRE SINOPTICĂ

Celula este unitatea fundamentală de organizare morfologică și fiziologică a organismelor vii din cele cinci regnuri cunoscute.

Primele informații asupra celulei au avut la origine studiul efectuat în 1665 de către Robert Hooke, care a făcut observații asupra unor "preparate" (secțiuni) din tulpina de pluta. In aceeași perioadă Marcello Malpighi a constatat că celulele sunt prezente atât în organismele animale cât și în organismele vegetale.

In fine, ipoteza constituției celulare a materiei vii (la procariote și eucariote) a fost fundamentată și explicitată și în 1838 de către botanistul Matthias Jacob Schleiden (1804-1881), profesor la Universitatea din Jena și în 1839 de către zoologul Theodor Schwann (1810-1882), profesor la Universitatea din Louvain. Aceștia au elaborat o teorie unitară asupra morfologiei în lumea vie și au emis unele opinii asupra fiziologiei (recte a funcțiilor metabolice).

Ulterior Hageli a evidențiat rolul proceselor de diviziune celulară în înmulțire. In fine, Virchow introduce conceptul provenienței fiecarei celule dintr-o altă celulă, formulat lapidar prin *"omnis cellula ex cellula"*. Cea mai importantă contribuție a acestuia din urmă rămâne însă introducerea conceptului de "patologie celulară" (Virchow, 1858).

Conceptul de **procariote** (gr. pro-înainte; karion-nucleu) definește organismele unicelulare care sub raport ultrastructural relevă existența unui **nucleoid (zonă nucleară)**, formațiune cvasicentrică lipsită de membrana (anvelopa) perinucleară. Procariotele prezintă doar diviziune celulară mitotică.

Pentru a avea o imagine generală a caracteristicilor morfofiziologice în tabelul 1-3 se prezintă date comparative privind virusurile şi procariotele.

Tabel 1-3. Caracteristici morfofiziologice generale la virusuri şi procariote (date comparative)

Virusuri	Specificare	Procariote
Acelular	Aspect morfologic	Celular
Virionul	Unitatea morfofuncțională	Celula procariotică (e. g.: bacteria)
Simetrie existentă: helicală, icosaedrică, etc.	Caracteristici morfometrice (simetrie)	Absența simetriei
Virionul- particulă virală cu capacitate infectantă *Virus*- formațiune genomică virală, liberă în celula-gazdă cu posibilități de replicație *Provirus*- formațiune genomică virală integrată cromosomului celulei gazdei	Status funcțional (bio- tipuri, participare la procese biologice, ş. a.)	Sporul celular- formă vegetativă staționară biologic Celula- formațiune aptă pentru diviziunea indirectă
Replicație în celula gazdă	Multiplicare naturală	Diviziune celulară
În celula vie a) inoculare pe ou embrionat b) culturi celulare c) animale de experiență	Multiplicare în laborator	În medii acelulare
Absentă	Biosinteza de enzime metabolice	Prezentă
Rezistente	Sensibilitate la antibiotice	Sensibile
Prezent (obligatoriu intracelular)	Parazitism	Absent (exceptând genurile Clamydia şi Rickettsia- parazitism intracelular)

BCU IAŞI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Aceste date, compilate din literatura de specialitate (Nayak, 1978; Purves şi Orians, 1987; Zarnea, 1990; de Duve, 1991), oferă o imagine sinoptică care permite explicitarea diferenţelor şi similitudinilor existente între virusuri şi procariote importante în cercetările din domeniul biologiei moleculare şi biochimiei.

Investigaţiile ulterioare, bazate pe procedee microscopice (electronomicroscopia) şi tehnici biochimice (autohistoradiografia, ultracentrifugarea diferenţială, urmată de determinări analitice ş.a.), au demonstrat existenţa unor similitudini între celulele procariotice şi celulele eucariotice sub raport morfofiziologic, dar şi a unor deosebiri esenţiale. In acest context o importanţă aparte au avut cercetările asupra genomului celular, vizând în mod expres structurile cromosomale, compoziţia DNA cromosomal (şi chiar extracromosomal) etc. Toate acestea au condus la reconsiderarea conceptului de celulă în accepţia de "unitate fundamentală de organizare morfofiziologică şi genetică".

Aşa cum s-a arătat, organizarea ultrastructurii nucleare - caracteristice aparatului genetic - a condus la clasificarea organismelor în procariote şi eucariote. In continuare se descriu aspectele morfofiziologice şi topochimice specifice organismelor procariote (prenucleare). La acestea se prezintă diverse aspecte referitoare la ultrastructură.

1.6.2. ULTRASTRUCTURA SI TOPOBIOCHIMIA CELULELOR PROCARIOTICE

Procariotele sau pronucleatele sunt organisme constituite din celule cu o ultrastructură specifică. Se consideră că procariotele reprezintă cele mai simple forme de organizare celulară din sistemele biologice. Celulele denumite "procariotice" nu posedă nucleu înconjurat de membrana perinucleară şi nici organite celulare delimitate de membrane proprii.

Dintre procariote mai cunoscute sunt archebacteriile şi eubacteriile. Archebacteriile reprezintă cele mai vechi vieţuitoare ale Terrei, care pot exista în medii extrem de ostile: temperaturi ridicate (e.g.: 70 - 75°C); pH acid (1,0 - 3,0); salinitate crescută. Aceste organisme fac obiectul de studiu al unor domenii speciale ale biologiei. Eubacteriile constituie o altă categorie de procariote, în care se includ majoritatea speciilor de bacterii, alge albastre-verzi (cianobacterii) spirochete, rickettsii şi micoplasme (Lehninger, 1980).

Teoria celulară modernă (Purves şi Orians, 1987; Rawn, 1989; de Duve, 1991; Rhoades şi Pflanzer, 1992; Cross şi Mercer, 1993) poate fi redusă, în principal, la existenţa a patru trăsături fundamentale:

- celulele se integrează morfologic în materia vie;
- toate celulele provin din alte celule;
- informaţia genetică necesară pentru menţinerea celulelor existente şi formarea de noi celule, este transmisă de la o generaţie la alta;
- reacţiile biochimice din organism (i.e. procesele metabolice) se desfăşoară în celule.

Procariotele sunt reprezentate de organisme unicelulare, de sine stătătoare (celulele procariotice). Eucariotele sunt organisme multicelulare la care celulele se integrează ca părţi constituente ale diverselor ţesuturi (celulele eucariotice). In general se afirmă că fiecare celulă este *"totipotentă"*, deoarece conţine toată informaţia genetica necesară formării unei noi celule (Purves şi Orians, 1987).

O imagine generală a celulei procariotice se redă în fig.1-8 prezentându-se particularităţile morfologice ale acesteia. Modelul schematizat are în vedere una din celulele mult studiate în biologia celulară - celula bacteriei Gram-negativ numită Escherichia coli, care se află permanent în intestinul uman. Această bacterie Gram-negativă are diametrul de cca. 1 μm şi lungimea de 2 μm.

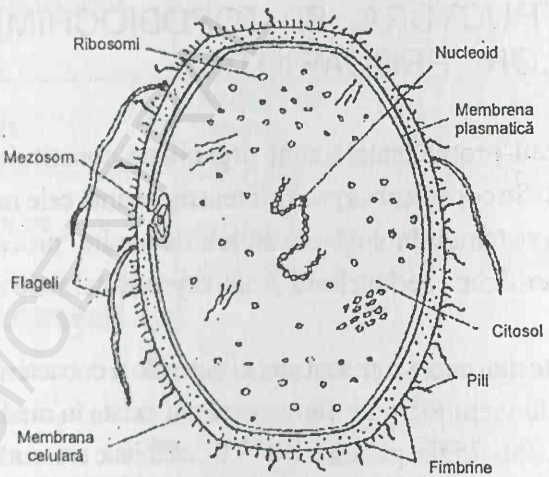


Fig. 1-8. Celula procariotică (reprezentare schematică)

Sub raport morfologic, celulele procariotice (bacteriile) variază foarte mult, prezentând un remarcabil polimorfism, existând însemnate variaţii în funcţie de mediu (Cohen, 1976; Sokatch şi Ferretti, 1976; Thomas, 1979; Alberts et al., 1983). Având în vedere

diversitatea de "forme bacteriene" s-a estimat că acestea reprezintă un criteriu taxonomic şi s-a convenit ca estimarea formei să se facă - convenţional - pe celulele tinere din culturi, în condiţii optime de temperatură, de pH şi presiune de oxigen (Zarnea, 1983).

În acest context, în funcţie de formă, bacteriile se pot grupa în cinci categorii:

a) *sferice*, e.g.: coci de diverse tipuri: simpli, diplo-, strepto-, tetra-, stafilococi ş.a.;
b) *cilindrice*, e.g.: bacili la care se distinge o axă mică şi o axă mare;
c) *spiralate* sau *helicoidale*, e.g.: vibrionul, spirilul, spirocheta (acestea fiind tipurile mai caracteristice);
d) *filamentoase* - prezintă similitudini cu fungii, unele putându-se ramifica;
e) *pătrate* - întâlnite în mediile cu salinitate crescută.

Dat fiind conţinutul general al acestui volum şi spaţiul redus afectat, s-a renunţat la exemplificarea unor genuri de bacterii care aparţin formelor bacteriene mai sus menţionate (v. detalii în Stainer et al., 1970; Thomas, 1979, ş.a.).

Evaluarea caracteristicilor morfologice ale bacteriilor a evidenţiat posibilitatea estimării dimensiunilor axiale (lungime/lăţime), ale suprafeţei celulare şi chiar a greutăţii.

Dimensiunile au fost măsurate cu ajutorul microscopului, distingându-se celule foarte mici cvasisferice, e.g.: la Mycoplasma species cu diametrul de 125-250 μm şi celule mari, e.g.: la Saprospora grandis cu lăţimea de 0,8-1,0 μm şi lungimea până la 500 μm, această specie putând genera şi forme filamentoase. Bacteria cea mai studiată, E.coli, are dimensiunile de cca 0,5-2,0 μm.

Mărimea celulelor poate fi evaluată prin raportare la o scară lineară, măsurându-se diametrele longitudinal şi transversal şi calculându-se suprafaţa, volumul, sau chiar greutatea. Asemenea operaţii se efectuează prin morfometrie - procedeu uzitat în studiile de histochimie şi morfopatologie (Taşcă, 1976; Simionescu şi Simionescu, 1988; Olinici şi Vaida, 1997).

Studiul biomoleculelor informaţionale şi, în general, a biomoleculelor prezente în celule vizează cunoaşterea ultrastructurii celulare şi a relaţiei structură chimică-activitate biologică la bioconstituenţi (Cohen, 1976; Kruh, 1987, Gârban, 1992).

In definirea ultrastructurii celulare şi bioconstituenţilor celulari, un rol esenţial are *citotopobiochimia*. Acest domeniu al biochimiei are ca obiect de studiu compoziţia chimică a celulei, cu localizarea bioconstituenţilor şi evidenţierea proceselor fizico-chimice, care au loc la nivelul acesteia.

1.6.2.1. Nucleoidul

La procariote - considerate organisme prenucleate - se distinge doar o formaţiune ultrastructurală cu dispunere cvasicentrică denumită *"nucleoid"* sau *"zonă nucleară"*, care nu este circumscrisă de o membrană proprie. In cadrul nucleoidului se află materialul

genetic reprezentat de DNA dublu catenar (dublu helix). Se estimează că DNA din nucleoid are lungimea de cca. 1,2 nm şi diametrul de 0,2 nm. (Lehninger, 1980).

Acidul deoxiribonucleic prezent în nucleoid se află strâns spiralat, asociat cu proteine non-histonice. Acest DNA se află în aşa numitul "*genofor*" (gr.gennao-a da naştere şi phorein-a purta).

În accepţia acestui termen se poate considera că nucleoidul conţine "*genoforul procariotic*". Evident pentru DNA dublu catenar (dc-DNA) prezent în genofor, se va utiliza denumirea de *"DNA genoforal"*.

Cu referire la termenii menţionaţi se impune reconsiderarea faptului că - în lipsa unor convenţii internaţionale asupra terminologiei de specialitate - aceştia sunt utilizaţi în unele tratate de profil în sensuri improprii.

Denumirea de "genofor" a fost propusă în 1963 de Ris şi Chandler (citaţi de Giosan şi Săulescu, 1969), pentru a desemna "orice grupă de gene înlănţuite". Astfel a existat iniţial sinonimie între denumirile macromoleculelor de DNA din nucleoidul procariotelor şi din nucleul eucariotelor, utilizându-se termenul de "genofor" atât pentru procariote cât şi pentru eucariote (Giosan şi Săulescu, 1972). În timp s-a încercat o delimitare terminologică utilizându-se exclusiv termenul de "cromosom" doar în sensul accepţiei originale, interesând exclusiv celulele eucariotice.

Deci, la celulele procariotice în nucleoidul lipsit de un înveliş propriu există "genoforul" în care se stochează materialul genetic sub forma de "DNA genoforal". Această moleculă cu topologie de dc-DNA specifică pentru bacterii are o lungime de cca. 1 nm şi conţine o informaţie care poate codifica cca. 2000-3000 de proteide diferite.

Se reiterează faptul că în celula procariotică (gr.pro-înainte, karyon-nucleu) există nucleoid - formaţiune asemănătoare nucleului care însă este lipsit de anvelopă (membrană) perinucleară. În interiorul nucleoidului se află "genoforul" care conţine DNA genoforal. În celula eucariotică (gr.en-bine; karyon-nucleu) există nucleu delimitat prin anvelopă (membrană) perinucleară. În interiorul nucleului se află cromosomii care conţin DNA cromosomal. Celulele eucariotice sunt caracteristice organismelor unicelulare animale dar şi organismelor superioare vegetale, animale şi organismului uman (v.Cap.1.6).

Pentru a exista o distincţie între celulele procariotice şi eucariotice din punctul de vedere al topobiochimiei convenim a utiliza explicit noţiunile de genofor în cazul nucleoidului şi de cromosom în cazul nucleului.

1.6.2.2. Citoplasma

Citoplasma celulelor procariotice reprezintă masa internă cvasiomogenă, cu aspect granular fin. Este prezentă atât la procariote cât şi la eucariote.

Datorită aspectului cvasiomogen, microgranular, fluidul citoplasmatic vâscos a fost denumit şi *citosol*. Concentraţia proteinelor din citosol este mare, depăşind 20%. Majoritatea

proteinelor sunt reprezentate de enzime, care participă la procesele metabolice. In citosol se mai află şi alţi metaboliţi organici (glucide, lipide), precum şi compuşi anorganici (săruri) sau bioanorganici (metaloproteide, săruri ale unor acizi graşi etc.).

In interiorul citoplasmei se află organitele celulare caracterizate, în general, printr-o structură mai simplă.

1.6.2.3. Formaţiuni intracelulare

Mai restrânse ca număr şi definite prin elemente ultrastructurale şi funcţionale mai limitate, formaţiunile intracelulare procariotice relevă câteva caracteristici definitorii.

In cadrul noţiunilor referitoare la formaţiunile intracelulare se discută ribosomii, granulele de depozitare, plasmidele ş.a.

1.6.2.3.1. Ribosomii

La procariote nu există reticul endoplasmic, neexistând înveliş perinuclear. Astfel, ribosomii se dispun într-un cadru "nestructurat" din cauza absenţei formatiunilor membranare limitante.

Mărimea ribosomului procariotic cu S_{20w} de 70 S este 20 nm x 17nm, iar a subunităţilor ribosomale rezultate prin disociere este următoarea: la subunitatea majoră cu S_{20w} de 50 S este 14 nm x 17 nm; la subunitatea minoră cu S_{20w} de 30 S este de 9 nm x 17 nm

S-a constatat că la concentraţii scăzute ale ionilor de Mg^{2+} - cuprinse între valorile 10^{-2} - 10^{-4} M - ribosomii disociază reversibil în două subunităţi inegale de 30 S, respectiv 50 S (fig.1-9).

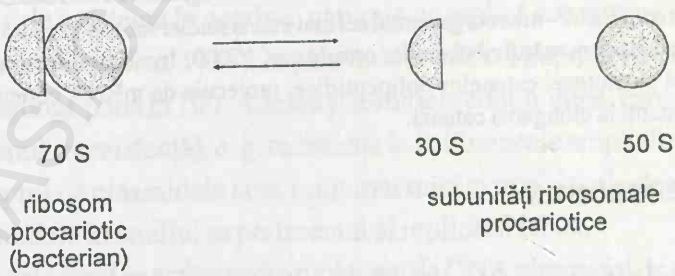


Fig. 1-9. Disocierea ribosomilor din celulele procariotice

Ribosomii celulelor procariotice sunt particule cvasisferice care au diametre de 140 - 270 Ă. Constanta de sedimentare este de 70 S, iar masa moleculară de $2,7 \cdot 10^6$ Da. Constanta de sedimentare reprezintă un indiciu al mărimii moleculei. Aceasta se poate nota prin cs sau prin s. Pentru definirea mai riguroasă se are în vedere temperatura mediului - raportându-se la 20°C şi natura mediului - în mod curent

BCU IAŞI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

este mediul apos (engl.water-apă). Din aceste motive în unele tratate apare notaţia S_{20w} pentru constanta de sedimentare. Valoarea S_{20w} este extrem de redusă, exprimarea se face în unităţi Svedberg (S). In cazul ribosomilor procariotici S_{20w} este de 70 S, iar în cazul ribosomilor eucariotici S_{20w} este de 80 S.

Disocierea particulelor ribosomale (ribosomilor) a fost investigată cu ajutorul microscopiei electronice şi al metodelor ultracentrifugale, prin care s-a determinat constanta de sedimentare.

Ambele subunităţi sunt esenţiale pentru biosinteza proteinelor. In procesul de biosinteză a proteinelor macromoleculelor de acid ribonucleic mesager (mRNA) şi de acid ribonucleic de transfer (tRNA) se leagă de subunitatea de 30 S. Catena polipeptidică rezultată din biosinteza ataşată la macromolecule de tRNA se leagă de subunitatea de 50 S.

S-a mai observat că în cazul unor concentraţii crescute de ioni de Mg^{2+}, particulele ribosomale de 70 S agregă (Ayad şi Blamire, 1972). In acest caz se formează asociaţii cu constanta de sedimentare de 100 S (fig.1-10).

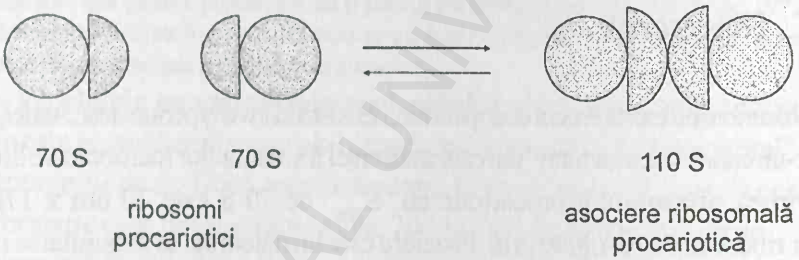


Fig. 1-10. Asocierea ribosomilor din celulele procariotice

Subunităţile ribosomale de 30 S şi 50 S au masa moleculară de $0,85 \cdot 10^6$ Da, respectiv de $1,8 \cdot 10^6$ Da. Ambele subunităţi conţin 64% RNA şi 36% proteine.

Obţinerea subunităţilor ribosomale menţionate se face prin ultracentrifugare, în gradient de concentraţie a sucrozei. La finalul ultracentrifugării se realizează fracţionarea.

In cazul bacteriei E.coli - microorganismul cel mai intens studiat sub raport morfologic, fiziologic şi biochimic - s-a constatat că numărul ribosomilor este de cca. 15000. In ribosomi se produce biosinteza proteinelor. In cursul biosintezei catenelor polipeptidice, molecula de mRNA concură la eliberarea aminoacizilor participanţi la elongarea catenei.

1.6.2.3.2. Mezosomul

Mezosomul a fost considerat iniţial ca şi "corp periferic" (Chapman, 1953), apoi ca "membrană intracitoplasmatică", "plasmalemasom" etc.

Ca şi formaţiune membranară intracitoplasmatică, mezosomul relevă trei particularităţi definitorii: a) sub raport ultrastructural derivă din membrana celulară prin invaginarea acesteia; b) sub raport morfologic se pretează extrudării din "sacul mezosomal"

în proximitatea membranei celulare (de fapt între membrana plasmatică şi sacul mezosomal); c) sub raport funcţional este implicat în activitatea genoforului bacterian şi în procesul de sporulare (Reusch şi Burger 1973; Greenawalt, 1975).

Mezosomul asigură echipartiţia materialului genetic (i.e. DNA genoforal) în condiţiile absenţei unui aparat mitotic (aparatul mitotic este prezent doar la eucariote).Astfel mezosomul procariotic (bacterian) se prezintă ca o "interfaţă" la care se leagă DNA genomic. In acest sens se relevă faptul că mezosomul are un "situs de legare" la genomul bacterian (Reusch şi Burger, 1973).

Rolul mezosomului în replicarea şi segregarea genomului bacterian a fost demonstrat pe baze morfologice, genetice şi biochimice (Zarnea, 1983). Activitatea mezosomului este corelată cu aceea a membranei plasmatice, precum şi a DNA genoforal din nucleoid şi DNA plasmidal din plasmidele bacteriene.

Cu privire la mezosomi se mai reţine faptul că aceste formaţiuni intervin în interacţiile redox (îndeosebi transportul de electroni) şi interacţiile de fosforilare din organismele procariote.

1.6.2.3.3. Plasmidele

In citosolul majorităţii bacteriilor se află nişte formaţiuni intracelulare de constituţie specială denumite *plasmide*. Acestea sunt fragmente de DNA propriu plasmidelor, i.e. *DNA plasmidal*, independent de DNA din nucleoid.

Constituţional, plasmidele sunt formate din molecule de DNA dublu catenar circular şi uneori suprarăsucit. In mod natural plasmidele se află în bacterii şi unele eucariote unicelulare (i.e. drojdia).

Plasmidele existente în condiţii naturale se replică autonom, comportându-se ca nişte cromosomi mici (Rawn, 1989). In plasmide se află cel puţin trei gene, uneori numărul acestora poate ajunge până la 100. Adesea plasmidele conţin gene, care conferă rezistenţă la antibiotice (antibiorezistenţă), e. g. rezistenţa la antibioticele ampicilină, tetraciclină etc.

Prin faptul că plasmidele sunt mult mai mici şi mai simple decât cromosomii se pot utiliza ca modele în studiul experimental al replicării DNA.

Plasmidele fiind constituite din molecule de DNA plasmidal de dimensiuni reduse (cca. 5000 pb) se pretează experimentelor in vitro şi in vivo. Astfel, plasmidele pot fi manipulate în investigaţiile din *domeniul biologiei moleculare şi ingineriei genetice*. In acest context se menţionează folosirea plasmidelor (recte a DNA plasmidal) în biologia moleculară modernă, pentru aplicaţii în tehnologia DNA recombinant.

Problema DNA plasmidal a suscitat un interes aparte, odată cu dezvoltarea acestei tehnologii prin care a devenit posibil transferul DNA la alte celule procariotice sau eucariotice. Astfel s-a ajuns la conceptul de "vector plasmidal" pentru DNA plasmidal.

In cadrul prezentării plasmidelor se impune şi menţionarea faptului că aceste formaţiuni intracelulare nu sunt necesare pentru supravieţuirea bacteriei. Există şi bacterii lipsite de plasmide.

In cazul prezenţei plasmidelor în celulele bacteriene s-a observat că acestea au replicare independentă, dar cu o rată aproximativ apropiată cu aceea a genoforilor bacterieni (numiţi adesea "cromosomi bacterieni") şi, implicit, a înmulţirii bacteriei (Purves şi Orians, 1989).

1.6.2.3.4. Granule de depozitare

Sunt formaţiuni prezente în citosol la numeroase bacterii (între acre şi la E. coli). In majoritatea cazurilor, granulele de depozitare conţin polglucide, dar uneori pot conţine şi acid poli-8-hidroxibutiric (Lehninger, 1980).

Aceşti compuşi asigură, la nevoie, energia necesară celulei procariotice. Prin biodegradare enzimatică din poliglucide se formează glucoza liberă, iar din acidul poli-8-hidroxibutiric se formează monomerul acestuia, acidul 8-hidroxibutiric. Procesele de biodegradare sunt reacţii exergonice în cursul cărora se eliberează energie.

1.6.2.3.5. Vacuole

Incluse în masa citoplasmatică a bacteriilor, vacuolele se prezintă ca nişte formaţiuni cvasisferice cu diametre de 0,3-0,5 μm. Sunt circumscrise de un "înveliş unistratificat" de natură lipoproteică.

In accepţia cunoştinţelor actuale nu se poate preciza dacă vacuolele sunt formaţiuni ultrastructurale permanente necesare stocării unor metaboliţi hidrosolubili sau temporare (structurate de novo) în condiţiile excesului de apă şi metaboliţi hidrosolubili. Substanţele de natura lipidică şi protidică, de compoziţie mai complexă, circumscriu vacuolele constituind acel "înveliş unistratificat", cunoscut sub numele de tenoplast.

In organismul unor procariote (e.g.: bacterii albastre şi verzi) se pot întâlni **vezicule cu gaze**. Remarcabil este faptul că astfel de formaţiuni se află doar în procariote. Prezenţa acestora a fost sesizată prin utilizarea microscopului cu contrast de fază. Veziculele cu gaze au forme cilindrice şi pot ajunge la lungimi de 200-1000 nm şi diametrul de 75 nm circumscrise de o "membrană monostrat" permisivă doar pentru gaze care acced prin difuziune. Graţie structurii şi rolului biologic, veziculele cu gaze au mai fost denumite şi **aerosomi.**

Cu ajutorul microscopului electronic s-a constatat că veziculele cu gaze aparţin în fapt unui "organit compus". Grupându-se mai multe vezicule formează un mic ansamblu intracelular, care realizează subsisteme vacuolare. Detaliile ultrastructurale şi funcţionale nu sunt pe deplin cunoscute.

In natură, celulele bacteriene care dispun în ultrastructură de vezicule de gaze, se consideră că pot "flota" la suprafaţa lichidelor (e.g.: pe suprafaţa lacurilor) şi că dispun de un sistem fotoprotector în raport cu anumite radiaţii naturale.

1.6.2.3.6. Aparatul fotosintetizant

O caracteristică de esenţă a celulelor procariotice este reprezentată de "aparatul fotosintetizant". Acesta este localizat în proximitatea membranei plasmatice, prezentându-se sub formă de: invaginaţii membranare extinse, vezicule membranare simple, sisteme lamelare simple, sisteme lamelare complexe extinse pe faţa interna a membranei.

Comparativ cu aceste formaţiuni care morfologic reprezintă "aparatul fotosintetizant" la celulele procariotice, se remarcă faptul că la celulele eucariotice există organite celulare specializate. Aceste organite ale celulor procariotice cu membrană proprie, sunt cunoscute sub numele de "cloroplaste" şi participă direct la procesul de fotosinteză.

Topologia distribuţiei aparatului fotosintetizant la bacterii relevă numeroase particularităţi. Astfel, de la cele mai simple structuri internalizate la nivelul membranei plasmatice, cum ar fi vezicule membranare simple (invaginate) la unele bacterii sulfuroase (Thiorhodaceae), sisteme lamelare (simple sau complexe) la Athiorhodaceae şi până la formaţiuni de tipul unor sacule (prezentând asemănări cu cloroplastul) - la Gloebacter se întâlnesc tot felul de ultrastructuri caracteristice aparatului fotosintetizant.

Activitatea biologică însă la nivelul acestui aparat, atât de diferit sub raport morfologic, prezintă trăsături fiziologice comune intervenind în procesul de fotosinteză.

1.6.2.3.7. Alte formaţiuni intracelulare

In celulele procariotice s-au mai decelat incluziuni şi magnetosomi - formaţiuni cu proprietăţi morfofiziologice specifice.

Incluziunile s-au decelat electronografic ca formaţiuni ultrastructurale care apar în citoplasma la finea perioadei de creştere. Compoziţia chimică a acestora este caracterizată prin prezenţa unor macromolecule organice (e.g.: macromolecule de glicogen, amidon) sau anorganice (e.g.: polimetafosfat) şi/sau a unor combinaţii anorganice simple (e.g.: carbonat de calciu, sulfat coloidal s.a.). Sub raport fiziologic incluziunile participă la activitatea metabolică a celulei bacteriene. Acestea conţin şi eliberează, la nevoie, materiale de rezervă pentru procesele metabolice.

Magnetosomii - sunt particule ultrastructurale care electronografic evidenţiază o zonă opacă dispusă centric şi un halou cvasitransparent. In zona centrală se află compuşi care conţin fier. Datorită prezenţei fierului, magnetosomii concură la orientarea şi migrarea celulelor bacteriene în câmpuri magnetice slabe. Magnetosomii conferă bacteriilor care-i conţin proprietatea de magnetotactism.

1.6.2.4. Membrana celulară

Membrana celulară la procariote delimitează mediul intern al celulei de mediul extern. Organismele procariote unicelulare prezintă anumite particularităţi morfofiziologice decelabile la nivelul membranei celulare. Aceste particularităţi sunt dependente şi de faptul că celulele procariotice se află solitare sau în grup şi se deplasează în mediul ambiant.

Structural, membrana celulei procariotice evidenţiază un strat dublu lipidic în care "microscopic" se surprind moleculele proteice care traversează acest strat cu grosimea medie de 9 nm. In **membrana celulară**, numită şi **membrana plasmatică** se află lipide (45%) şi protide (55%) specifice. Compoziţia lipidelor şi protidelor membranare diferă de la un tip de celule procariotice la altul (Rawn, 1989). Remarcabil este faptul că membrana plasmatică (celulară) are permeabilitate selectivă pentru diverşi bioconstituenţi condiţionată de compoziţia lipoprotidică..

La exteriorul membranei celulare, studiile microscopice au permis evidenţierea unui **perete celular** cu o grosime mai mare (cca. 20 nm). Peretele celular este constituit dintr-un schelet rigid format din catene polizaharidice şi scurte catene de legătură de natură polipeptidică. Peretele celular protejează bacteria de factorii din mediul ambiental, implicit de acţiunea hipo- sau hipertermică. La suprafaţa acestuia se află diverse formaţiuni membranare (e.g.: flageli, pili, fimbrine).

Sub raport ultrastructural, prezenţa unui *perete celular* implică o anumită rigiditate, dată predilect de prezenţa proteoglicanilor şi poliglucidelor. Existenţa peretelui celular cu o arhitectură moleculară specifică pentru celulele procariotice (întâlnit şi la celulele eucariotice vegetale), fac mai dificile cercetările de biologie moleculară.

Particularităţile ultrastructurale şi topobiochimice ale peretelui celular bacterian au condus şi la gruparea în bacterii Gram-pozitive şi bacterii Gram-negative. O succintă caracterizare a acestora se face în continuare.

Bacteriile Gram-pozitive - au peretele celular constituit din: a) *mureină* (lat. murus-perete) multistratificată - un glicozaminoglican în care există o componentă proteică

(cu conţinut de alanină, glutamină, homoserină, acid glutamic ş.a.) şi o componentă prostetică de natură glucidică (în care se pot afla N-acetil hexozamine, i.e. N-acetilglucozamina şi acidul N-acetil muranic); b) *poliglucide* - în care domină diverşi derivaţi ai hexozelor şi hexozaminelor; c) *acizi teichoici* (gr. teichos - zid, perete) - care conţin 1,5-poliribitolfosfat şi 1,3-poliglicerolfosfat - sunt localizaţi în peretele celular şi membrana celulară bacteriană; d) *acizi teichuronici* - în compoziţia cărora se află acid glucuronic şi N-acetilglucozamină şi diglucide - se află în peretele celular bacterian în asociere cu acizii teichoici; e) *acizi lipoteichuronici* - care conţin şi mici cantităţi de glicerofosfolipide; f) *proteine* independente de componenta proteidică din mureină; g) *ioni metalici* (predilect ioni de Mg^{2+}) care intervin în procesele membranare.

Se menţionează faptul că acizii teichoici şi teichuronici se află doar în bacteriile Gram-pozitive.

Bacteriile Gram-negative - prezintă un perete celular mai subţire în care s-a decelat: a) *mureină* monostratificată - glicozaminoglican cu compoziţia dată mai sus; b) *poliglucide* care conţin monoglucide de tipul galactoză, ramnoză, colitoză (3,6-dideoxi-galactoză) - prezentă în E. coli, paratoză (3,6-dideoxi-glucoză)-prezentă în Salmonella paratyphi ş.a.; c) *lipoproteine* formate din: lipide - care conţin acizi graşi diferiţi (în general acizi graşi C_{10} - C_{17} şi β-hidroxilaţi) în funcţie de genul de bacterii, e.g.: β-hidroxidecanoic (C_{10}- caprinic) la Pseudomonas; β-hidroxitetradecanoic (C_{14} - miristic) la Enterobacterii şi din proteine - aflate sub forma unor catene peptidice care conţin diverşi amino acizi, e.g.: alanina, serina, acid glutamic (dicarboxilaţi), lisină, ornitină (ultimii doi diaminaţi); d) *lipopoliglucide* - care conţin predilect glucozamino-4-fosfat, acid 3-hidroxitetradecanoic (acid gras legat de glucozamină şi colaminfosfolipide); e) *fosfolipide* - care sunt reprezentate de acizii fosfatidici şi derivaţii acestora, îndeosebi colaminfosfolipide (etanolfosfolipide).

Lipopoliglucidele din bacteriile Gram-negative reţin numeroşi determinanţi antigenici care conferă complexitate şi specificitate antigenică bacteriilor. Fixarea anticorpilor la acest nivel diminuă fagocitarea bacteriilor şi creşte astfel capacitatea infectantă a acestora.

In ansamblul său membrana celulară asigură o permeabilitate selectivă permiţând tranzitul predilect pentru apă, ioni metalici şi anumiţi bioconstituenţi cu moleculă mică şi cu rol în troficitate. Moleculele care prezintă legături macroergice (e.g.: ATP ş.a.) ca şi enzimele angajate în procesele bioenergetice, sunt localizate predilect în membrană.

Membrana celulară şi peretele celular bacterian au rol de "sită moleculară" asigurând tranzitul diverşilor compuşi cu moleculă mică (oligopeptide, oligozaharide,

compuşi hidrofili cu masă moleculară mică) şi blocând tranzitul diferitelor substanţe nocive (predilect compuşi macromoleculari).

1.6.2.5. Flageli, pili, fimbrine

Aceste formaţiuni sunt considerate ca apendici protidici aciformi, care pornesc de la peretele celular. Se întâlnesc la E.coli şi alte bacterii. Se face remarca faptului că la celulele procariotice structurile limitrofe externe membranei celulare rezidă în prezenţa acestor formaţiuni apendiculare.

In cazul celulelor eucariotice - constituite în ţesuturi - în exterior se dispune matricea extracelulară cu particularităţi morfo-fiziologice bine delimitate şi aspecte topochimice specifice.

În continuare se descriu succint particularităţile morfologice şi funcţionale precum şi anumite aspecte topochimice ale acestor formaţiuni apendiculare.

Flagelii (lat. flagela - bici) - sunt formaţiuni externe de dimensiuni mai mari, care determină mobilitatea celulei. La E.coli, spre exemplu, flagelii asigură deplasarea bacteriei cu o viteză de 50 mm/sec. Această viteză asigură o deplasare care depăşeşte de mai multe ori lungimea corpului bacteriei.

Pili (lat. pili - păr) - sunt formaţiuni extramembranare mai scurte decât flagelii. Caracteristic acestora este faptul că participă la conjugarea sexuată, intervenind astfel în procesul de reproducere.

Fimbrinele (lat. fimbrinae - fir, firicel, fibră) - se constituie, de asemenea, ca formaţiuni apendiculare extramembranare. Acestea asigură aderarea la suprafeţele conexe.

Datele prezentate mai sus - deşi nu pe deplin elucidate asupra topochimiei - oferă informaţii care permit explicitarea unor aspecte fiziologice şi fiziopatologice referitoare la procariote

1.6.3. CICLUL CELULAR LA PROCARIOTE

Având în vedere diversitatea morfofuncţională şi topobiochimică caracteristică procariotelor, nu este posibilă definirea unui "ciclu celular specific". Se estimează că este mai adecvat a se uzita conceptul de "ciclu vital", denumire care justifică, în măsură mai mare, complexitatea activităţii celulare la procariote.

In acest context s-a arătat că în funcţie de modul de comportare în cursul evoluţiei în mediile naturale de existenţa - in vivo sau în mediile de cultură - in vitro, celulele

BCU IASI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

procariotice prezintă mai multe "tipuri de cicluri celulare" (Whitensburg şi Dow, 1980 - citaţi de Zarnea 1983).

Pornind de la aceste considerente se menţioneaza existenţa urmatoarelor tipuri:

- ciclul celular vegetativ monomorf - întâlnit la bacteriile care există sub un singur tip morfologic;
- ciclul celular vegetativ dimorf - prezent la bacteriile caracteizate prin existenţa a doua tipuri de celule diferite morfologic încă de la diviziune;
- ciclul celular vegetativ polimorf - specific bacteriilor care, în condiţiile unei nutriţii diferite, produc doua sau mai multe tipuri de celule distincte morfologic;
- ciclul vegetativo-sporal - caracteristic doar anumitor bacterii. La aceste bacterii alături de ciclul vegetativ există şi ciclul sporal în cursul căruia are loc sporogeneza.

O privire de ansamblu, a condus la accepţia existenţei a două tipuri generale:

a) ciclul celular vegetativ, cu subtipurile: mono-, di- şi polimorf;
b) ciclul celular vegetativo-sporal care integrează două subsecvenţe diferenţiate morfofuncţional.

Particularităţile tipurilor de cicluri celulare constituie, în general, caracteristici morfofiziologice ale diferitelor clase şi genuri de bacterii.

1.7. ELEMENTE MORFOFIZIOLOGICE SI TOPOBIOCHIMICE SPECIFICE EUCARIOTELOR

1.7.1. PRIVIRE SINOPTICA

In acceptia cunoştinţelor actuale asupra citologiei - expuse succint mai sus s-a acreditat o definiţie generală conform căreia celula este unitatea fundamentală de organizare morfofiziologică şi genetică a organismelor procariote şi eucariote.

Conceptul de **eucariote** (gr. eu-bine; karion-nucleu) defineşte organismele unicelulare şi multicelulare care prezintă celule cu nucleu individualizat, circumscris de o membrană (anvelopă) perinucleară care delimitează carioplasma de citoplasmă. Celulele eucariotice prezintă diviziune celulară mitotică şi meiotică.

Celulele eucariotice, numite şi celule *"nucleate"*, evidenţiază ultrastructuri celulare mai complexe. Astfel, la celula eucariotică nucleul este delimitat de membrana (anvelopa) perinucleară, precum şi organite celulare circumscrise de membrane proprii.

Decelarea diverselor "organite celulare" delimitate de membrane proprii, caracteristice pentru celulele eucariotice, a făcut posibilă deosebirea de "formaţiunile intracelulare" prezente la celulele procariotice. Dintre organitele celulare eucariotice se menţionează: mitocondriile, reticulul endoplasmatic, complexul Golgi, peroxisomii, plastidele.

Dimensiunile celulelor diferă în funcţie de ţesut şi rolul fiziologic. Spre exemplu, la om, cea mai mare celulă din organism este ovula (cca.200 μm), iar cele mai mici celule se află în cerebel (5-6 μm) şi în sânge (trombocitele au 3 μm).

Celulele se află grupate în diverse ţesuturi şi diferă prin formă, dimensiune şi rol fiziologic. Forma celulelor diferă mult, în general se întâlnesc formele: sferică (e.g. ovule, hematii, leucocite); alungite (cilindrice, fusiforme etc) e.g.: celulele musculare, celulele neuronale. Sub influenţa unor factori fizici şi/sau chimici, celulele pot lua forme variate: eliptice, discoidale, filamentoase, prismatice, piramidale.

In contextul abordării aspectelor morfofiziologice şi topobiochimice referitoare la celule eucariotice, este remarcabilă observaţia conform căreia "funcţiile trebuie înţelese în termenii structurilor, iar structurile trebuie înţelese în termenii chimiei" (Palade, 1959). Această afirmaţie - a distinsului savant american de origine română, George Emil Palade (laureat al Premiului Nobel, 1974) - are în vedere faptul că noţiunea de structură se identifică cu aceea de "ultrastructură celulară" (deci aspectul morfologic ultrastructural) şi se corelează cu compoziţia chimică (deci cu aspectul topobiochimic).

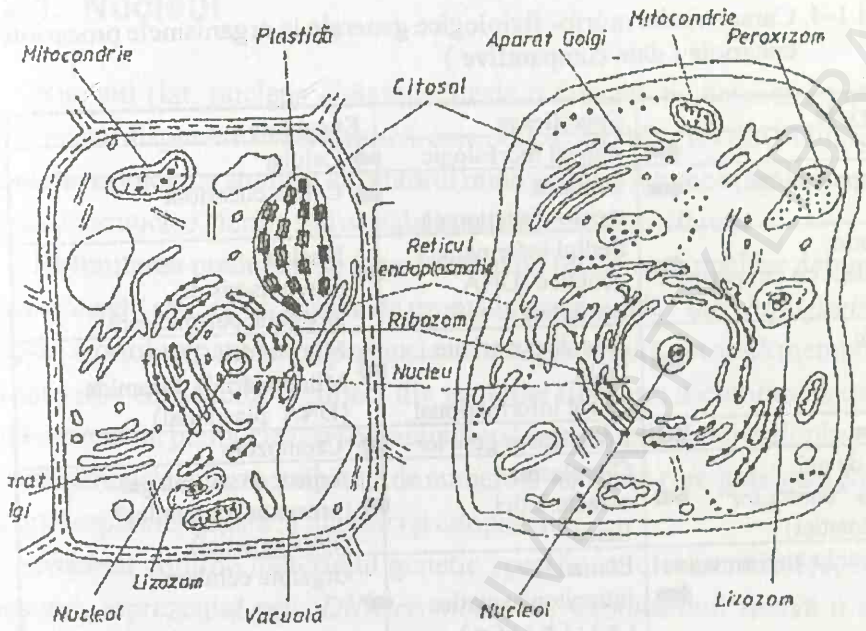
Studiul integrat al ultrastructurii celulelor şi al bioconstituenţilor acestora bazat pe metode microscopice şi pe metode biochimice a adus un însemnat aport la dezvoltarea biologiei celulare şi moleculare.

1.7.2. ULTRASTRUCTURA SI TOPOBIOCHIMIA CELULELOR EUCARIOTICE

Ierarhia organizării celulei implică asamblarea diverselor complexe supramoleculare şi constituirea unor formaţiuni ultrastructurale (subcelulare), decelabile prin fracţionare ultracentrifugală.

Sub raport morfologic celulele sunt constituite din diverse formaţiuni subcelulare. Ultrastructura şi funcţiile specifice ale acestor formaţiuni sunt determinate de anumite particularităţi ale compoziţiei chimice.

In fig. 1-11 se prezintă imaginile celulelor eucariotice, cu evidenţierea unor diferenţe existente între celulele vegetală şi animală.



Celulă vegetală **Celulă animală**

Fig. 1-11. Celula vegetală şi celula animală (reprezentare schematică)

Problema bioconstituenţilor celulari face obiectul topobiochimiei celulare (citotopobiochimia). Biomoleculele aparţinând diverselor clase de substanţe (protide, lipide, glucide, compuşi biominerali) participă la procesul de morfogeneză a ultrastructurii celulare şi la desfăşurarea armonioasă - coordonată în timp şi spaţiu - a multiplelor reacţii de biodegradare şi de biosinteză din celule.

Descriptiv se discută natura biomoleculelor şi aspecte generale privind relaţia structură chimică-activitate biologică. Heterogenitatea ultrastructurii celulare se corelează cu localizarea citotopobiochimică a biomoleculelor în diferite formaţiuni subcelulare şi participarea acestora la diverse procese fizico-chimice (metabolice). O reprezentare generală a principalelor caracteristici morfofiziologice comparative la organismele procariote şi eucariote se redă în tabelul 1-4, cuprinzând o sinteză a informaţiilor compilate din literatura de specialitate (Alberts et al., 1983; Holzman şi Novikoff, 1984; Darnell et al., 1986; Purves şi Orians, 1987; Zarnea, 1990; deDuve, 1991). Astfel de informaţii, prezentate sinoptic, sunt importante pentru definirea discrepanţelor şi similitudinilor de interes ştiinţific şi didactic pentru biologia celulară şi moleculară.

Tabel 1-4. Caracteristici morfo- fiziologice generale la organismele procariote şi eucariote (date comparative)

Procariote	Specificare	Eucariote
Celular ⬅	Aspect morfologic	➡ Celular
Celula procariotă ⬅	Unitatea morfo- funcţională	➡ Celula eucariotă
Nucleotid (în contact cu citoplasma) ⬅	Sediul informaţiei genetice (DNA genomic)	➡ Nucleu (circumscris de anvelopa perinucleară)
Absente ⬅	Alte dispuneri ale DNA cu rol informaţional	➡ Mitocondrii (DNA Mitocondrial). Plasmide (DNA plasmidal)
Genofor ⬅	Localizarea genelor	➡ Cromozom
Aspect de gel (absenţa "curenţilor" citoplasmatici) ⬅	Citoplasma- caracteristici fizice	➡ Aspect de sol sau gel (prezenţa "curenţilor" citoplasmatici)
Formaţiuni citoplasmatice ⬅	Elemente intracitoplasmatice (a) ; (b) ; (c)	➡ Organite celulare
Prezenţi ⬅	a) Ribosomi	➡ Prezenţi
Absente	b) Mitocondrii	➡ Prezente (celula vegetală şi animală)
Absente ⬅	c) Cloroplaste	➡ Prezente (celula vegetală)
Permeabilă pentru: apă, Cationi şi anioni anorganici; molecule mici de acizi graşi, monoglucide, acizi aminaţi, fragmente de DNA. Perete celular prezent (conţine predilect glicozaminoglicani şi derivaţi poli-β-glucopiranocizi) ⬅	Membrana celulară (caracteristici generale)	➡ Permeabilă pentru: apă, cationi şi anioni anorganici; molecule glucidici şi lipide mici, proteine; lipoproteine; fragmente de DNA (unele particule de Tranziţie sunt vizibile la microscop). Perete celular Prezent la celulele vegetale (conţine predilect derivaţi poli-β-glucopiranozici)

Celulele eucariotice evidenţiază o anumită specificitate în "arhitectura" ultrastructurii. În acest context, sub raport morfofuncţional şi topobiochimic, se pot distinge: nucleul celular, citoplasma, organitele celulare, citoscheletul, membrana celulară. Descrierea succintă a acestora se face în continuare.

1.7.2.1. Nucleul

Nucleul (lat. nucleus - sâmbure) este o formațiune caracteristică celulelor eucariotice, cu dispunere cvasicentrică, care ocupă cca. 1/3 - 1/4 din volumul acesteia. Preparatele histologice studiate cu ajutorul microscopiei fotonice (optice) au evidențiat existența unor nuclee sferice sau ovoidale cu diametre de 5-10 μm.

Delimitarea nucleelor se face de către un înveliș perinuclear denumit *"membrana nucleară"* sau, cu un termen de uzanță internațională *"anvelopa perinucleară"*. Sub raport morfologic anvelopa perinucleară este constituită din două membrane: membrana internă - constituită predilect din proteine fibrilare; membrana externă - care delimitează spațiul perinuclear și se continuă cu lumenul reticulului endoplasmatic (RE). Anvelopa perinucleară este străbătută de numeroși *pori*, prin care se asigură continuitatea dintre nucleoplasmă (aflată în interior) și citoplasmă.

Nucleul conține materialul genetic specific celulei eucariotice, localizat în cromosomi, reprezentat prin *DNA cromosomal*. Cromosomii relevă o arhitectură complexă, evidențiind - în ultrastructură - formațiuni specifice denumite *"nucleosomi"*. Nucleosomii sunt formați din DNA reiterativ (deobicei lipsit de informație) și DNA non-reiterativ.

Întregul ansamblu al acestor macromolecule realizează un complex denumit *cromatină* care conține DNA cromosomal; enzimele implicate în biosinteza proteinelor (în procesele de replicație-transcripție-translație); factori de reglare a expresiei genice. Cromatina este distribuită neuniform în celulă, fapt care a permis evidențierea la microscop a două tipuri: *eucromatina* - caracterizată prin arii mai slab colorate, corespunzând formei transcripțional active; *heterocromatina* - caracterizată prin arii dens colorate, reprezentând forme înalt condensate (de obicei adiacente anvelopei perinucleare) și transcripțional inactive. În cursul diviziunii celulare din cromatină se formează cromosomii în care se află genele.

Sub raport topobiochimic, în nucleu se află cantități însemnate de acid deoxiribonucleic (DNA), reprezentând cca 95% din întregul conținut de DNA celular. S-au decelat de asemenea acid ribonucleic (RNA) și proteine. Proteinele nucleare pot fi histone - de natură bazică sau non-histone - în general de natură acidă (Kaplan și Delpech, 1990).

În interiorul celulei se află o formațiune sferică - **nucleolul** în care se produce sinteza RNA ribosomal. Nucleolul are un diametru de 1-2 μm fiind mai crescut în perioada de activare a procesului de transcripție. Restul masei nucleare este ocupat de nucleosol sau nucleoplasmă delimitată de structurile dimembranare ale anvelopei nucleare.

Nucleul este sediul biosintezei acizilor nucleici, comparativ cu citoplasma în care are loc biosinteza proteinelor. La nivelul porilor nucleari se produce un tranzit permanent, constând în penetrarea spre nucleu a proteinelor şi dinspre nucleu a RNA, de obicei asociat cu proteine (sub formă de nucleoproteine). Ultrastructurile descrise caracterizează celulele eucariotice.

În linii generale procesele de stocare ale informaţiei genetice şi succesiunea proceselor de replicaţie-transcripţie-translaţie prezintă numeroase similitudini la celulele procariotice şi eucariotice.

1.7.2.2. Citoplasma

Citoplasma reprezintă fluidul intracelular, nestructurat, cu aspect cvasiomogen şi cu o fină granulaţie, prezent în celula eucariotică. In cursul fracţionării celulelor (prin centrifugare) citoplasma se eliberează constituind supernatantul, rezultat după sedimentarea nucleelor, a resturilor de organite celulare şi a fragmentelor membranare.

In biologia celulară s-au acreditat diverse denumiri, cum ar fi **matricea citoplasmatică**, **hialoplasma** sau **citosol**, toate acestea caracterizând acea parte a citoplasmei în care se află organitele celulare (Benga, 1985). Astfel, se poate afirma că citosolul este mediul intern al celulei în care coexistă organitele celulare.

Progresele realizate în studiul ultrastructurii celulare (bazat pe datele electronomicroscopiei) au relevat non-omogenitatea structurii citoplasmatice şi existenţa unui *citoschelet*. In citoplasmă coexistă diverse tipuri de organite celulare, între care se menţionează: mitocondriile, reticulul endo-plasmatic, ribosomii, complexul Golgi, cloroplastele, peroxisomii ş.a. (Zetkin et al., 1968; Manolescu et al., 1979; Ploaie şi Petre, 1979).

La nivelul citoplasmei se află - în stare dizolvată sau în stare coloidală - diverse substanţe: macromolecule, molecule mici şi ioni. In urma eliberării, prin fracţionare, a organitelor celulare se obţine deci, citosolul, care reprezintă partea solubilă a citoplasmei. Citosolul conţine proteine, cca. 20% (între care aminoacizi liberi, unele specii de RNA, care participă la biosinteza proteinelor şi enzimelor), glucide, lipide şi electroliţi.

In ansamblul său citoplasma asigură: vehicularea internă (intracelulară) a biomoleculelor şi ionilor constituenţi; desfăşurarea continuă a reacţiilor ana- şi catabolice de la nivelul celular; continuitatea interacţiilor biochimice diverse; interacţiile fiziologice dintre diverse formaţiuni intracelulare; participarea celulei la schimbul de energie şi informaţie cu mediul extracelular.

1.7.2.3. Organite celulare

Investigațiile asupra ultrastructurii celulare şi a bioconstituenților celulari a beneficiat de utilizarea metodelor histochimice, a microscopiei electronice, a ultracentrifugării, a metodelor fizico-chimice aplicate în biochimia analitică şi altor metode de acuratețe. Prin astfel de investigații a devenit posibilă descoperirea, în citoplasmă, a diverselor formațiuni subcelulare denumite **"organite"** celulare sau - cu un termen mai vechi - **"organéle"** celulare.

O sistematizare a datelor privind ultrastructura organitelor celulare şi atributele funcționale ale acestora a condus la observația că există trei tipuri de organite, denumite uzual:

a) organite citoplasmatice *generale* - întâlnite în toate celulele vegetale şi animale, cum ar fi: mitocondriile, reticulul endoplasmatic, complexul Golgi ş.a.

b) organite citoplasmatice *specifice* - diferite (în funcție de regn) la celulele vegetale e.g.: plastide, vacuole şi celulele animale e.g.: peroxisomi.

c) organite citoplasmatice *speciale*, prezente în celulele care îndeplinesc funcții specializate, e.g.: miofibrile - în celulele musculare; neurofibrilele - în celulele nervoase.

In continuare se prezintă principalele organite celulare remarcându-se particularitățile morfofiziologice şi topobiochimice.

1.7.2.3.1. Mitocondrii

Aceste organite celulare se prezintă sub formă de elipsoide, care au axele de 1-2 μm, respectiv 0,1-0,5 μm. Sub asopect ultrastructural, mitocondria evidențiază o membrană limitantă dublă: *membrana externă* - care conține diverse enzime, între care monoaminooxidaze (notate adesea prin abrevierea MAO), tiokinaze ş.a.; *membrana internă* - cu conținut de enzime din lanțul respirator, e.g.: enzime care controleaza interconversia dintre adenozintrifosfat (ATP) şi adenozindifosfat (ADP). De la membrana internă pornesc spre interior septumuri denumite *criste*. Acestea sunt cu atât mai numeroase cu cât activitatea respiratorie a celulei este mai crescută. Interiorul este reprezentat de *matricea mitocondrială*, în care (electronomicroscopic) se disting granule mai dense.

In fig. 1-12 se prezintă un model al mitocondriei în secțiune longitudinală (după Darnell et al., 1986).

In interiorul matricei mitocondriale s-au decelat mici protuberanțe cunoscute sub denumirea de "proteine complexe F_0F_1". Acestea sunt constituite din 15 specii de proteine

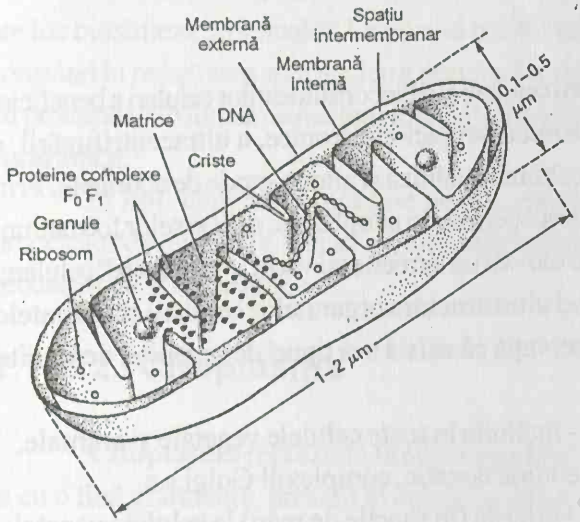


Fig. 1-12. Diagrama tridimensională a mitocondriei în secţiune longitudinală (după Darnell et al., 1986)

diferite, importante pentru faptul că aparţin sistemului de sintetaze pentru ATP (pornind de la ADP şi fosfat). Matricea conţine, de asemenea, enzime care participă la ciclul Krebs, la oxidarea acizilor graşi, la metabolismul acizilor nucleici (DNA şi RNA).

Mitocondriile relevă o înaltă specializare în procesele respiratorii şi oxidative. La nivelul mitocondriilor au loc procesele de energogeneză, fiind considerate furnizorii esenţiali ai energiei din celule.

Aceste organite reprezintă sediul a patru funcţii cu atribute metabolice distincte:

- respiraţia celulară - care asigură producerea energiei celulare. Interacţiile specifice acestei funcţii sunt catalizate de sisteme multienzimatice localizate în membrana internă;
- sinteza de acid adenozintrifosforic ATP - se realizează în cadrul unor reacţii de fosforilare care au capacitatea de a recupera energia prin sinteza ATP, pornind de la ADP şi fosfat. Enzimele capabile de-a realiza sinteza - utilizând energia produsă - sunt localizate în particulele legate de membrana internă. Această membrană controlează tranzitul substanţelor oxidabile, a ADP şi diverşilor ioni. După sinteză, ATP nou format părăseşte mitocondria.
- desfăşurarea reacţiilor din ciclul Krebs - care au loc sub acţiunea enzimelor localizate în matricea mitocondrială. În cadrul proceselor metabolice ciclul Krebs sau ciclul acizilor tricarboxilici (ciclul ATC) este important pentru "caracterul integrativ". Ciclul ATC asigură corelarea diverselor căi biochimice specifice metabolismelor glucidic, lipidic şi protidic.
- oxidarea acizilor graşi - se produce cu concursul enzimelor prezente, de asemenea, în matricea mitocondrială.

Membrana internă intervine în concentrarea ionilor de Ca^{2+}. Mitocondriile celulelor

din anumite organe sunt sedii ale unor metabolisme particulare: ureogeneza, sinteza de porfirine ş.a.

În biologia moleculară şi în genetică este important a se cunoaşte faptul că mitocondriile şi cloroplastele (organite celulare specifice pentru celulele vegetale) se pot diviza independent de diviziunea celulară. Capacitatea acestora de a se autoreproduce în cursul diviziunii celulare atestă faptul că posedă o certă autonomie genetică. Acest fapt este confirmat şi de prezenţa unor molecule de DNA, proprii acestor organite celulare.

In mitocondriile celulelor eucariotice se află DNA circular cu lungimea de 5 μm şi masa moleculară de 10^7 Da. Cuantumul DNA *mitocondrial* (mt-DNA) este de 1% în raport cu DNA celular total şi codifică mai multe proteine ale membranei interne, RNA de transfer şi RNA ribosomal specific mitocondriilor. DNA mitocondrial se prezintă ca o moleculă independentă de la care porneşte sinteza proteică mitocondrială, bazată pe un restrâns sistem ribosomal - *mitoribosomii*.

Totuşi, peste 90% din proteinele mitocondriale sunt sintetizate în citoplasmă la nivelul ribosomilor citoplasmatici, sub controlul DNA cromosomal din nucleu. Aceste proteine se inseră pe membranele mitocondriale, traversează aceste membrane şi ajung în matrice.

Existenţa DNA mitocondrial a condus la ideea de gene mitocondriale sau gene extranucleare. Aceste gene concură la realizarea "genomului mitocondrial" (v. Cap. 5). O particularitate a mt-DNA rezidă în transmiterea citoplasmatică non-mendeliană şi exclusiv pe linie maternă a unor mutaţii la nivel mitocondrial (de Duve, 1991).

1.7.2.3.2. Reticulul endoplasmatic. Ribosomii

Reticulul endoplasmatic (RE) este constituit dintr-un ansamblu de reţele dispuse paranuclear, sub forma unor "vezicule intercomunicante" (Palade, 1955). *Anvelopa (membrana perinucleară)* se prelungeşte spre citoplasmă generând formaţiuni membranare sub formă de canalicule şi vezicule aplatizate (Darnell et al., 1986; Rawn, 1989).

Compartimentele interioare, numite cisterne, comunică între ele prin sistemul de canalicule menţionat (fig. 1-13).

Acest ansamblu de reţele, cunoscut sub numele de *reticul endoplasmatic*, din punct de vedere ultrastructural, evidenţiază două tipuri de reticule. Cu ajutorul microscopului electronic, au fost decelate: RE granular sau rugos - *reticulul endoplasmatic rugos* (RER); RE agranular, neted sau lis - *reticulul endoplasmatic lis* (REL). Aspectul rugos este dat de depunerea ribosomilor pe formaţiunile membranare canaliculare.

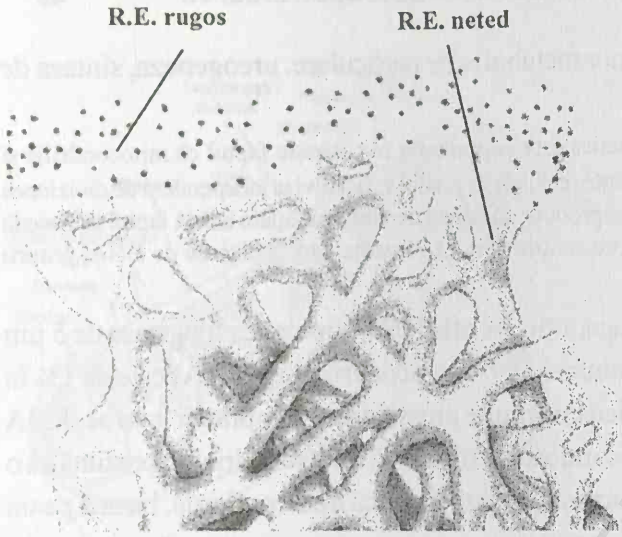


Fig. 1-13. Morfologia reticulului endoplasmatic (după Rawn, 1989)

In celule ribosomii se pot afla în stare liberă - *ribosomi izolaţi,* sau grupaţi - *poliribosomi,* desemnaţi adesea şi prin denumirea simplificată de *polisomi.*

In omogenatele celulare supuse centrifugării prelungite, după eliminarea nucleului, mitocondriilor şi lizosomilor se obţine un sediment constituit din artefacte care au la origine resturi ribosomale şi reticulare constituind aşa numiţii *microsomi.* Un studiu extins al microsomilor hepatici a fost efectuat de Palade şi Siekewitz (1956).

Ribosomii eucariotici sunt constituiţi din RNA de diverse tipuri şi din proteine. La celulele eucariotice ribosomii au în medie diametre de 220-300 A. Constanta de sedimentare este de 80 S, iar masa moleculara atinge $4 \cdot 10^6$ Da. Subunităţile ribosomale au constante de sedimentare (S_{20W}) diferite 40 S şi 60 S, cu masele moleculare de $1{,}3 \cdot 10^6$ Da, respectiv $2{,}6 \cdot 10^6$ Da.

Ribosomii din organitele celulare au constante de sedimentare mai reduse, de cca. 55 S (i.e. mitocondrii şi cloroplaste). După cum s-a arătat, pentru ribosomii din mitocondrii este deja acreditat termenul de "mitoribosomi" sau "ribosomi mitocondriali".

Morfologic (ultrastructural), ribosomii sunt formaţi din două subunităţi ribosomale a căror coeziune se menţine prin ionii de Mg^{2+}. In cazul scăderii concentraţiei ionilor de Mg^{2+} se produce disocierea ribosomului eucariot de 80 S în două subunităţi inegale de 40 S respectiv de 60 S (fig. 1-14).

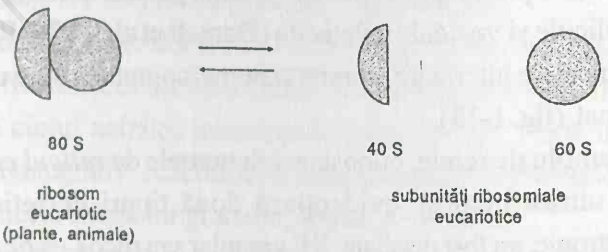


Fig. 1-14. Disocierea ribosomilor din celule eucariotice

În cazul fracționării ribosomilor la eucariote, prin centrifugare de zonă la 35.000g/4 ore în gradient de sucroză (20% la baza eprubetei și 5% la suprafața acesteia) și controlul specrofotometric al centrifugatului (la lungime de undă 260 nm) se obține curba cu un maxim (pic) corespunzător ribosomilor tip 80 S. Dacă se procedează la o dializă pentru îndepărtarea ionilor de Mg^{2+} și apoi la o centrifugare mai avansată (50.000g/15ore) în gradient de sucroză (la aceleași valori) urmate de spectrofotometrie, în aceleași condiții, se va obține o curbă cu două picuri corespunzând subunităților de 60 S și 40 S. Reprezentarea schematică a datelor spectrofotometrice la lungimea de undă de 260 nm a extincțiilor (E) în funcție de gradientul de concentrație (C) se redă în fig. 1-15.

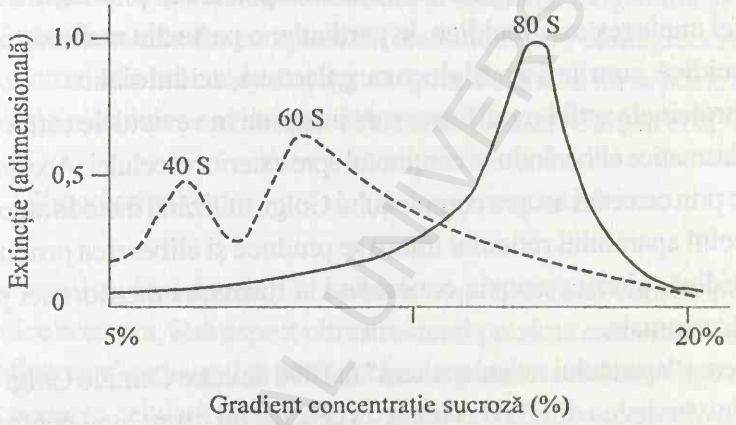


Fig. 1-15. Curbele spectrometrice pentru ribosomi și subunitățile ribosomale

La ribosomii eucariotici subunitatea majoră (60 S) este formată din cca. 45 prote-ine desemnate prin L_1, L_2, ..., iar subunitatea minoră (40 S) include 33 proteine, desemnate prin S_1, S_2,... .

Principalul rol biochimic al ribosomilor rezidă în biosinteza proteinelor structurale și funcționale. Din acest considerent ribosomii sunt abundenți în celulele unde se produce o sinteza proteică activă e.g.: la eucariote în celulele hepatice, celulele pancreatice ș.a., iar la procariote în celulele bacteriene (ciclul vegetativ). Activarea sintezei proteinelor în ribosomi stimulează procesele de creștere celulară și este însoțită de activarea fosforilării proteinelor (Blorel, 1980).

Sub raport topobiochimic, în reticulul endoplasmatic s-au decelat și lipoproteine, probabil dispuse spre formațiunile membranare. Acești compuși sunt solubili în deoxicolat de sodiu și detergenți.

In general, condiționat de locul biosintezei, se poate considera că proteinele din organism se grupează în: *proteine celulare endogene* - a căror sinteză se realizează de către ribosomii liberi; *proteine celulare exogene* - care sunt sintetizate de ribosomii asociați reticulului endoplasmatic și apoi sunt eliminate în afara celulei (acestea de fapt sunt glicoproteine).

Proteinele sintetizate traversează membrana reticulului endoplasmatic şi ajung în spaţiul cisternelor. Prin reţeaua de canale ale RE se realizează transportul intracelular al proteinelor spre periferia celulei.

In cazul glicoproteinelor s-a constatat că glicanii (partea glucidică a glico-proteinelor) sunt sintetizaţi într-o zonă a reticulului endoplasmatic bogată în glucide (îndeosebi manoză). Glicoproteinele astfel sintetizate sunt vehiculate spre complexul Golgi, în veziculele acestuia, de unde ulterior sunt eliminate.

1.7.2.3.3. Complexul Golgi

Sub aspect morfologic *complexul Golgi* sau *aparatul reticular intern*, este format din mici vezicule aplatizate, unimembranare, adesea suprapuse. In complexul Golgi se adună glicoproteinele, care vin de la reticulul endoplasmatic şi îşi modifică glicanii. Se detaşează astfel unele resturi glucidice, în particular o parte din manoză, adăugându-se alte resturi glucidice, cum ar fi acetilglucoza, galactoza, acidul sialic.

Glicoproteinele astfel modificate sunt integrate în veziculele care vor fuziona cu membranele plasmatice eliberându-şi conţinutul spre exteriorul celulei. Aceste constatări au fost confirmate prin cercetări asupra complexului Golgi, utilizând metoda autora-diografiei.

La nivelul aparatului reticular intern se produce şi eliberarea produşilor celulari de natură protidică, ulterior aceştia concurând la formarea membranei plasmatice şi membranelor lizosomale.

Descrierea "aparatului reticular intern" în 1898 de către Camillo Golgi (1843-1926) - profesor la Universitatea din Pavia (Italia), a deschis un drum lung pentru cercetări de biologie celulară şi moleculară. La un moment dat s-a presupus că este un simplu artefact datorat imperfecţiunilor metodologice din histochimie (în etapele de fixare şi colorare). Nu se credea că are o funcţie distinctă în economia celulară.

După 1953, prin cercetări efectuate cu ajutorul microscopiei electronice s-a elucidat în mare măsură rolul acestui organit denumit curent "aparat Golgi" sau "complex Golgi", O remarcabilă sinteză documentară asupra cercetărilor privitoare la aparatul Golgi s-a făcut de către Farquahar şi Palade (1981). S-a evidenţiat faptul că organitul celular discutat prezintă imagini electronomicroscopice variate: lamele, vacuole, vezicule, acest "status ultrastructural" pledând în favoarea denumirii de "complex Golgi".

1.7.2.3.4. Peroxisomi

Peroxisomii sau **microcorpii** sunt organite celulare specifice celulelor animale, care se prezintă sub forma unor vezicule unimembranare cu diametrul de cca. 0,5 μm.

BCU IAŞI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Matricea peroxisomală conţine peste 40 enzime, care operează concertant cu alte enzime produse în afara peroxisomului şi care catalizează o varietate de reacţii de biodegradare şi de biosinteză. In peroxisomi se află enzime oxidative, e.g.: uratoxidaza, izocitrat dehidrogenaza, catalaza, D-aminoacid-oxidaza etc.

Microscopic, peroxisomii se pot observa în mod obişnuit în celulele animale. Prezenţa acestora a fost însă sesizată şi în anumite celule vegetale. Informaţiile nu sunt concludente. Se estimează că în celulele vegetale, peroxizomii se pot forma îndeosebi în cursul germinaţiei semînţelor.

Enzimele peroxisomale participă la procesele oxidative şi au un rol esenţial în procesele de detoxifiere alimentară (e.g.: xenobiotice, etanol) sau medicamentoasă. Astfel, spre exemplu, catalaza intervine în procesele de descompunere a apei oxigenate (provenită din reducerea oxigenului în celule), conducând la formarea oxigenului şi apei. Un tipic exemplu de detoxifiere este descompunerea etanolului prin biodegradarea în sistemul PEOS (peroxysomal ethanol oxidyzing system), când etanolul nu se poate oxida integral la acetaldehidă prin acţiunea enzimei alcooldehidrogenază (Gârban et al. 1996).

1.7.2.3.5. Glioxisomi

Glioxisomii au fost decelaţi în celulele vegetale, fiind consideraţi ca organite celulare specifice acestora. Sub aspect ultrastructural prezintă asemănări cu peroxisomii.

Identificarea glioxisomilor s-a făcut în citoplasma celulelor vegetale prin studii bazate pe fracţionarea celulară (Darnell et al., 1986). Glioxisomii se află doar în plante - îndeosebi în plantele tinere - în care au loc transformări ale unor metaboliţi lipidici în metaboliţi glucidici (Purves şi Orians, 1987).

Studiile electronomicroscopice au condus la decelarea unor organite celulare numite "microcorpi"; care se formează prin desprinderea sub formă de vezicule a unor părţi din reticulul endoplasmatic rugos. Microcorpii au diametre de 0,2-1,7 micrometri , prezintă un înveliş unimembranar, iar în interior evidenţiază o ultrastructură granulară. Microcorpii se prezintă sub formă de peroxisomi - prezenţi în celulele animale şi sub formă de glioxisomi prezenţi în celulele vegetale. Aceste observaţii au fost emise pe baza studiilor asupra ultrastrcuturii organitelor celulare.

Denumirea de glioxisom face referire la participarea acestor organite celulare în metabolismul acidului glioxilic (OHC – COOH). Mai exact în celulele vegetale există enzime specifice, i.e. *izocitrat-liaza* (1) şi *malat-sintetaza* (2), care participă la "ciclul acidului glioxilic" numit şi "ciclul glioxilatului". Secvenţa care interesează aceste enzime se rezumă la interacţiile:

(1) (2)

-----> acid izocitric ----------> acid glioxilic ----------> acid L-malic ----->

Enzimele menţionate se află în citoplasma celulelor vegetale, fiind specifică acestora. Ciclul acidului glioxilic nu se întâlneşte la animalele superioare.

În fapt, enzima conduce la descompunerea acidului izocitric în acid glioxilic şi acid succinic. În continuare, sub acţiunea enzimei *malat-sintetaza*, acidul glioxilic şi acetil - coenzima A ($H_3C - CO - S - CoA$), prin condensarea Cleisen formează acidul L-malic. Aceste două reacţii sunt caracteristice pentru ciclul acidului glioxilic şi se pretează integrării în ciclul acizilor tricarboxilici (ciclul Krebs).

Ciclul acidului glioxilic realizează un bypass al reacţiilor de decarboxilare oxidativă specifice ciclului acizilor tricarboxilici. În acest mod, în celulele vegetale se produce o creştere a concentraţiei acidului oxalilacetic, din care se realizează conversia spre glucoză în cadrul procesului de gluconeogeneză (Gârban, 1999).

1.7.2.3.6. Lizosomi

Sub raport ultrastructural, **lizosomii** au forma unor vezicule sferice, unimembranare, cu diametrul de 0,25-0,50 μm. Aceste organite se află predilect în celulele din ficat, rinichi şi în leucocite.

Ultrastructura lizosomală a permis evidenţierea a două clase de organite: lizosomi primari - care conţin doar enzime digestive; lizosomi secundari - în constituţia cărora se află enzime şi molecule diverse (denumite cu termenul generic "substrate") supuse procesului de digestie lizosomală.

Compatibilitatea substrat-enzimă în cazul digestiei lizosomale - în urma căreia se formează vacuola (vezicula) digestivă este redată în fig. 1-16.

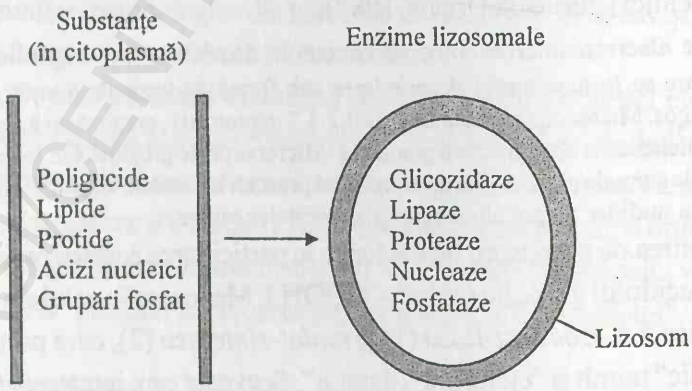


Fig 1-16. Compatibilitatea pentru interacţii enzimatice
(substrate intercitoplasmatice-enzime lizosomale)

BCU IAŞI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Lizosomii constituie sedii ale *digestiei intracelulare* realizate prin fagocitoză şi pinocitoză. O esenţială particularitate a lizosomilor rezidă în autodigestia componentelor celulare, după moartea celulei, fenomen denumit *apoptoză* sau *apoptosis* (termen preluat din biologia celulară vegetală).

Termenul de "apoptoză" - în opinia noastră - este preferabil a fi integrat domeniului mai complex al "tanatocitozei"şi discutat alături de termenul de "necroză" pentru considerentele prezentate mai detailat în cadrul acestui capitol (v.Cap. 1.7.4.)

În biologie există noţiunile de efecte "tanatogene" (care conduc la moarte) şi "teratogene" (care conduc la malformaţii), aplicate în domeniile eredobiologiei şi embriologiei.

La nivelul lizosomilor se află cca. 50 de *enzime hidrolitice*, între care: proteaze acide, nucleaze, lipaze (pentru lipidele simple şi pentru sfingolipide), enzime hidrolizante ale glicozaminoglicanilor ş.a. În prezent se cunosc cca. 30 boli ereditare caracterizate prin absenţa unei enzime hidrolitice din această grupă. Aceste maladii, cunoscute sub denumirea de "enzimopatii", sunt expresia acumulării excesive a compuşilor care reprezintă substratul pentru enzimele care lipsesc.

Membrana lizosomală protejează celula de acţiunea enzimelor hidrolitice. In anumite afecţiuni (e.g.: silicozele - maladii provocate de particule minerale) se distruge membrana lizosomală, situaţie în care enzimele lizosomale determină distrugerea celulei prin reacţii de hidroliză.

1.7.2.3.7. Centrosomul

In proximitatea nucleului - dispus în citoplasma celulei eucariotice animale - se află **centrosomul**. Din punctul de vedere al ultrastructurii, centrosomul este format din doi *centrioli* care sunt înconjuraţi de un material amorf pericentriolar. Centriolii se prezintă sub forma unor cilindrii scurţi dispuşi în triplete. In ansamblu nouă astfel de triplete se dispun cvasisimetric realizând o circumferinţă (Ganong, 1995).

Centrosomii se modifică numeric în cursul diviziunii celulare, realizându-se o duplicare a acestora. Perechile se deplasează spre polii fusului mitotic.

La celulele multinucleate se află un centrosom în apropierea fiecărui nucleu. Centrosomii acestor celule evidenţiază, de asemenea, modificări în timpul diviziunii celulare.

1.7.2.3.8. Plastide

Plastidele sunt organite citoplasmatice specifice celulei vegetale (din plantele superioare) şi unor protiste. Plastidele prezintă anumite caracteristici, între care se menţionează existenţa unui mic *genom propriu*, conţinând un *DNA specific*.

BCU "IOAN CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Plastidele constituie o familie de organite celulare în care se includ: proplastide, cloroplaste, cromoplaste, leucoplaste, amiloplaste şi etioplaste (Goodwin şi Mercier, 1983, Rawn, 1989; Gârban, 1999).

Ultrastructural, plastida prezintă o membrană limitantă dublă: externă şi internă. In interiorul plastidei se delimitează substanţa fundamentală fluidă - **stroma**. In acest fluid se află imersate formaţiuni derivate din membrana internă cu aspect de sacule" care constituie **tilacoizii**. Aceştia se grupează în formaţiuni lenticulare (discoidale) denumite **grana**. In grana se află clorofilă, proteine, fosfolipide, amidon etc.

In stroma plastidelor se află *microribosomi proprii*. Prezenţa acestora conferă plastidelor o autonomie genetică limitată, similară cu aceea a mitocondriilor (Sager, 1972; Purves şi Orians, 1987). Sub raport topobiochimic în plastide au fost decelaţi acizi nucleici (DNA şi RNA).

Proplastidele sunt formaţiuni primare, decelate în ultrastructurile citoplasmatice din celulele vegetale. Din protoplastidele prezente în celulele meristematice ale plantelor se formează diverse plastide. Deci proplastidele sunt precursori ai plastidelor. În continuare, plastidele pot evolua spre diferite tipuri de organite celulare distincte prin ultrastructură şi prin funcţia biologică, e.g.: cloroplaste; cromoplaste; leucoplaste etc.

Cloroplastele - sunt principalele organite de natură plastidică, prezente în plantele verzi, care conţin clorofilă şi asigură fotosinteza. In celulele vegetale se află una sau mai multe cloroplaste. În cloroplaste se află DNA specific cloroplastelor (ct-DNA), care are masa moleculară de 0,7-1,8 · 10^8 Da şi o moleculă circulară cu lungimea de 35-40 μm (Sengbusch, 1979).

Cloroplastele recepteaza energia luminoasă pe care o transformă în energie chimică şi o înmagazinează în ATP. Această energie este utilizată pentru biosinteza unor molecule organice pornind de la diverşi precursori (e.g.: biosinteza glucozei pornind de la CO_2 şi H_2O). Se realizează în acest mod procesul de fotosinteză" în cursul căruia plantele eliberează oxigenul molecular.

Cromoplastele - aparţin grupului plastidelor pigmentate de la galben la roşu, care nu participă la fotosinteză. Proplastidele, ca precursori ai plastidelor, pot evolua - condiţionat de factori interni (e.g.: genetici) şi de factori externi (e.g.: arealul existenţial şi agenţii fizico-chimici ai acestuia) spre cromoplaste. În celulele plantelor vii au fost decelate cromoplaste, care acumulează pigmenţii carotenoidici, dând colorаţii în galben, oranj, roşu petalelor şi fructelor produse de diferite specii de plante.

Leucoplastele - se află în ţesuturile epidermei şi în anumite ţesuturi interne. Au mărimi mai reduse, sunt lipsite de culoarea verde şi nu au rol în fotosinteză.

Amiloplastele - sunt plastide nepigmentate specializate pentru biosinteza şi stocarea granulelor de amidon.

Etioplastele - sunt stadii tranzitorii între proplastidele iniţiale şi cloroplaste, rezultate prin întreruperea acţiunii luminii.

Până în prezent nu se cunosc cu precizie căile de dezvoltare de la proplastide spre plastide, dar se ştie că genomul nuclear exercită în largă măsură un control în acest sens. Astfel, spre exemplu mutaţiile nucleare pot influenţa dezvoltarea cloroplastelor şi cromoplastelor.

1.7.2.3.9. Vacuole

Vacuolele sunt formaţiuni caracteristice ultrastructurii celulelor vegetale. In celulele tinere vacuolele sunt reduse ca dimensiuni, dar cresc cu înaintarea în timp comprimând citoplasma spre peretele celular.

In vacuole se află dizolvate glucide, săruri ale acizilor organici, pigmenţi, dioxid de carbon şi oxigen. La nivelul vacuolelor se separă produşii de excreţie ai celulelor vegetale şi treptat se produce îndepărtarea soluţiilor saline a căror concentraţie a crescut în timpul vieţii celulei.

1.7.2.4. Citoscheletul

Citoscheletul reprezintă sub raport ultrastructural o reţea fibroasă formată prin policondensarea proteinelor. Citoscheletul este implicat în mobilitatea celulară, modificarea formei, mitoza, transportul intracelular al macromoleculelor etc. Unele formaţiuni ale citoscheletului sunt asociate membranelor plasmatice şi pot interveni în transferul informaţiei de la celula la celulă. In procesele de carcinogeneză se produce o modificare a citoscheletului.

In constituţia citoscheletului se afla în mod curent trei formaţiuni: microtubulii, microfilamentele, filamentele intermediare.

Microtubulii - sunt formaţiuni cilindrice cu lungimea de 10-25 μm şi diametrul de 24 μm. Sunt formate prin autoasamblarea unui mare număr de molecule de proteine globulare (dimere) denumite **tubuline** cu masa moleculară de 53 KDa. Acestea pot aparţine tipurilor de *α-tubulină* şi *β-tubulină*. Prin asamblarea tubulinelor, în prezenţa proteinelor asociate, a ionilor de Ca^{2+} şi a guanozintrifosfatului (GTP) se formeaza microtubulii. Prin activitatea biologică microtubulii concură la mişcările cromosomilor din celule (în cursul mitozei şi a meiozei), la mişcările spermatozoizilor, a cililor, a flagelilor, în transportul intracelular (e.g.: în transportul proteinelor de-a lungul axonilor în celulele nervoase), în secreţiile hormonale. Un rol important au microtubulii în morfogeneza embrionară.

Microfilamentele - se prezintă ca nişte formaţiuni cilindrice alungite cu diametrul de 7 nm. In conţinutul acestora se află, în principal, o proteină globulară (monomeră) denumită *actină* cu greutatea moleculară de 42KDa. Aceasta se formează prin policondensare în prezenţa Ca^{2+}, Mg^{2+} şi a adenozintrifosfatului (ATP). Structura

microfilamentelor poate fi dezorganizată de citoşalazina B, o substanţă de proveniență vegetală, care poate împiedica separarea celulelor la sfârşitul mitozei.

O comparaţie între actina (aparţinând microfilamentelor) şi tubulinele de tip α şi β (care aparţin microtubulilor), relevă mai pregnant deosebirile de structură şi compoziţie. Astfel de date se prezintă, după Alberts et al. (1983) - modificat, în tabelul 1-5.

Tabel 1-5. Date comparative privind actina şi tubulina

Specificare	Actina	Tubulina
Masa moleculară a polipeptidelor (Da)	42.000	53.000 (α- tubulina) 53.000 (β- tubulina)
Forma iniţială (nepolicondensate)	Globulară (monomer)	Globulară (Dimer: 1 α + 1 β)
Legarea nucleotidelor (nepoliconensate)	ATP (1 per monomer)	GTP (2 per dimer)
Factori necesari pentru policondensare	Ca sau Mg; NaCl	Mg; NaCl
Forma policondensatului	2 lanţuri helicale	13 protofilamente
Diametrul filamentului (mm)	7	25

Microfilamentele, ca formaţiuni ale citoscheletului, intervin în creştere, morfogeneză şi în mişcările celulare.

Filamentele intermediare - sunt formaţiuni ale citoscheletului, caracterizate prin structură şi compoziţii diferite, cu diametrele de 8-10 nm. Se formează prin policondensarea uneia sau mai multor proteine a căror natură variază de la un tip de celulă la altul, în funcţie de natura ţesutului. Evident, în aceasta situaţie, s-au decelat proteine cu greutăţi moleculare diferite, de la 40-55 pâna la 70 KDa.

Se menţionează, în acest context, unele formaţiuni filamentoase din această grupă: *keratinele* (formate din 20 proteine de 40-70 KDa) în celulele epiteliale; *desminele* (proteine de 52 KDa) în muşchi; *vimentinele* (proteine de 55 KDa) în celule din mezenchim; *filamentele gliale* (proteine de 53 KDa) în celulele gliale; *neurofilamentele* (formate din trei proteine, care nu sunt pe deplin cunoscute) în neuroni. Aceste elemente ale citoscheletului intervin în procesele de creştere şi în morfogeneză.

1.7.2.5. Membrana celulară

Membrana celulară reprezintă învelişul extern al celulei constituit din biomolecule, care delimitează mediul intern al celulei de mediul extern.

Uzitând de un termen generic, membranele celulare au fost denumite biomembrane. Funcţia esenţială a biomembranelor este legată de fenomenul de permeabilitate. Permeabilitatea biomembranelor este importantă pentru procesele de transport transmembranar a ionilor şi moleculelor în cadrul schimburilor realizate între mediul intern şi mediul extern. Această membrană, care delimitează conturul celulei este denumită şi **"membrana externă"**, sau **"membrana plasmatică"**.

Se mai disting şi membrane intracelulare, care delimitează diferite organite, compartimentează spaţiul intracelular şi contribuie la organizarea mediului intern.

In raport cu membrana plasmatică, în tratatele de specialitate, se discută aspectele ultrastructurale şi rolul biologic al acestora (Benga, 1985).

1.7.2.5.1. Caracteristici ultrastructurale ale biomembranelor

Caracterizarea ultrastructurii membranelor s-a făcut cu ajutorul procedeelor microscopiei electronice şi a diverselor metode analitice biochimice. Astfel s-a decelat că membrana plasmatică (celulară) are grosimea de 8-9 nm şi este formată din molecule de lipide, protide şi cantităţi reduse de glucide. In figura 1-17 se prezintă schematic ultrastructura biomembranelor la celulele vegetală şi animală.

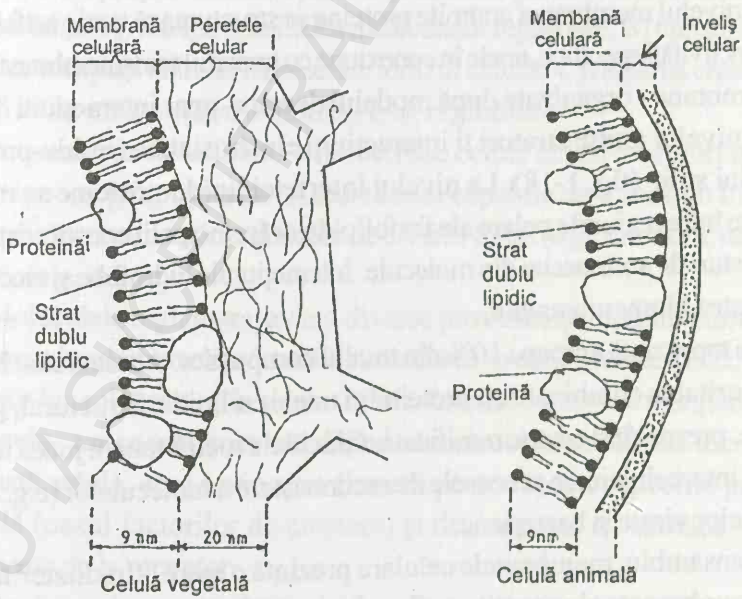


Fig. 1-17. Structura biomembranelor la celulele vegetală şi animală (reprezentare schematică)

Lipidele membranare sunt constituite, în principal, din fosfolipide, sfingolipide şi steride (conţinând predilect colesterol). Acestea sunt formate dintr-o *parte hidrofobă* - radicalul hidrocarbonat al acizilor graşi cu o catenă lungă în care apar grupări metilenice ($-CH_2-$) şi o *parte hidrofilă* - conţinând grupări hidroxilice (–OH), carboxilice (–COOH), fosfat ş.a. Structurarea polară a biomembranelor a reprezentat un subiect multă vreme controversat. In prezent se acceptă modelul de *"dublu strat lipidic"*. In dublul strat componentele hidrofobe (apolare) - reprezentate de catenele acizilor graşi - se orientează spre interior, respectiv spre citoplasmă, iar componentele hidrofile (polare) - menţionate mai sus se dispun spre exteriorul ultimului strat. Altfel spus, părţile hidrofile se dispun spre exteriorul celulei.

Acest model distratificat pentru membranele biologice a fost propus pentru prima dată de Singer şi Nicolsen (1972), fiind cunoscut sub numele de "model în mozaic fluid" (engl. fluid mosaic model).

Protidele din membrană sunt numeroase. Structural s-au decelat protide care se dispun astfel, încât se pot asocia părţii hidrofobe a lipidelor traversând membrana dintr-o parte în alta. Acestea sunt denumite *proteine integrate*. Există de asemenea, protide care se dispun fie spre interiorul, fie spre exteriorul celulei, acestea denumindu-se *proteine periferice* (interne şi externe).

La nivelul biomembranei, proteinele (asociate lipidelor) existente se consideră că au rol structural şi rol de efectori biochimici, e.g.: enzime, transportori, receptori etc. In prezent se consideră că la nivelul membranei anumite proteine se structurează steric astfel încât pot îndeplini anumite activităţi specifice, unele în conexiune cu tranzitul transmembranar.

In biomembrane - organizate după modelul descris - apar interacţiuni hidrofobe (lipide-lipide) la nivelul dintre straturi şi interacţiuni electrostatice (lipide-proteine) la extremele dublului strat (fig. 1-18). La nivelul interfeţei lipide-proteine se realizeaza legături electronice între regiunile polare ale fosfolipidelor (principalii constituenţi lipidici) şi sarcinile unor resturi de aminoacizi din molecule. Interacţiunile hidrofobe şi electrostatice determina stabilitatea biomembranelor.

Glucidele reprezintă aproape 10% din totalul compuşilor. Acestea sunt localizate spre exterior, majoritatea combinate cu proteine şi unele cu lipide. Structural, glucidele sunt foarte variate, prezentând catene ramificate. Glucidele membranare joacă un rol important în relaţiile intercelulare, în procesele de recunoaştere a moleculelor (e.g.: lecitine, toxine), a particulelor virale şi bacteriene.

Privite în ansamblu, membranele celulare prezintă o mare "fluiditate" facilitând deplasările transmembranare ale constituenţilor. Această "fluiditate" este dependentă de faptul că localizarea diverşilor constituenţi variază în timp.

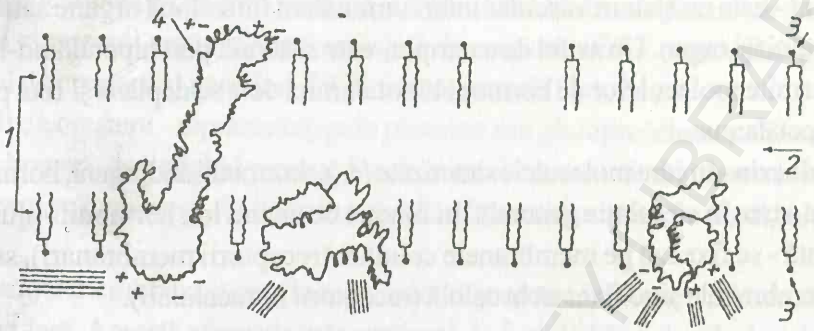


Fig. 1-18. Ultrastructura stratificată a biomembranelor - "model în mozaic fluid"
1) Strat biomolecular lipidic; 2) Componenta hidrofobă (apolară);
3) Componenta hidrofilă (polară); 4) Catena polipeptidică

În exteriorul membranei se află aşa numitul "înveliş celular" denumit cu un termen generic "glicocalix". Acesta este format din glicoproteine şi glicolipide care realizează un aşa numit mediu pericelular. Glicocalixul se dispune între celula propriu zisă şi matricea extracelulară.

1.7.2.5.2. Rolul biologic al membranelor

Din cunoştinţele existente până în prezent se pot atribui membranelor cel puţin trei roluri importante: A) fixarea specifică a moleculelor reglatoare; B) tranzitul transmembranar al diverşilor compuşi chimici (molecule, ioni) în celulă; C) reglarea creşterii celulare.

A. Fixarea specifică a moleculelor reglatoare

Pe membranele celulare a numeroase celule există receptori membranari, care sunt proteine sau glicoproteine. Acestea sunt capabile de-a fixa, cu înaltă afinitate şi o mare specificitate, molecule reglatoare de diverse tipuri (e.g.: hormoni, neurotransmiţatori, factori de creştere ş.a.).

Moleculele reglatoare, având diverse proveniențe topobiochimice celulare, sunt supuse unei circulaţii variate în celule. Astfel se crează diverse sisteme de transfer ale moleculelor (cu rol reglator) în şi între celule. In acest context se menţionează sistemele:

- **autocrin** - are ca particularitate faptul că moleculele sintetizate într-o celulă părăsesc această celulă, apoi revin şi se fixează pe un receptor specific prezent în aceeaşi celulă (cazul factorilor de creştere) şi declanşează o "cascadă" de procese care porneşte de la receptor.
- **paracrin** - este caracterizat prin faptul că moleculele sintetizate în diverse celule (cazul neurotransmiţătorilor) vin şi se fixează pe alte celule, vicinale cu acelea de proveniență.

- **port** - este un sistem vascular intercomunicant între două organe sau două părţi ale aceluiaşi organ. Un astfel de exemplu, este sistemul port hipotalamo-hipofizar, care permite moleculelor de hormoni hipotalamici de-a se deplasa şi fixa pe celulele din hipotalamus.
- **endocrin** - în care moleculele sintetizate (e.g.: hormonii androgeni, hormonii tiroidieni etc.) trec în circulaţia generală. In funcţie de natura lor, hormonii - ajunşi la celulele ţintă - se fixează pe membranele celulare (receptorii membranari), sau penetrează membranele şi se fixează în celulă (receptorii intracelulari).

B. Tranzitul transmembranar

Numeroase molecule şi ioni, după fixarea pe membrane, penetrează în celule. In abordarea problemei tranzitului transmembranar se disting unele diferenţe notabile între moleculele mici şi diverşi ioni, comparativ cu macromoleculele.

Membrana celulară contribuie la: delimitarea celulei şi compartimentarea interiorului acesteia; reglarea transportului transmembranar - funcţionând ca o bariera semipermeabilă; asigurarea homeostaziei biochimice a constituenţilor celulari; menţinerea presiunii osmotice şi al volumului lichidian al celulei etc (Metzner, 1984).

Din punct de vedere fizico-chimic tranzitul transmembranar relevă câteva particularităţi:

- are caracter vectorial: se realizează din exterior spre interior - *influxul* sau din interior spre exterior - *efluxul*
- prezintă specificitate: există sisteme de transport (şi evident mecanisme) diferite pentru molecule mici, ioni, macromolecule
- se poate realiza fără aport energetic (transportul pasiv) sau cu aport energetic (transportul activ)
- se caracterizează prin intercondiţonare: în acest sens se menţionează că există un tranzit biunivoc în condiţiile în care o substanţă penetrează în celulă, pe când o altă substanţă părăseşte celula.
- se poate produce în condiţiile acţiunii unui transportor care intervine - ino temporeatât în influx cât şi în eflux.

Transportul transmembranar reprezintă funcţia principală a biomembranelor. Acest transport se realizează prin două sisteme: de microtransport şi de macrotransport.

C. Reglarea creşterii celulare

Rolul membranei celulare în procesele de reglare a creşterii celulare se discută în funcţie de natura ţesuturilor.

In cazul eucariotelor creşterea celulară este stimulată de diverşi *factori de creştere*, dintre care mai cunoscuţi sunt: factorul epitelial de creştere - EGF (epithelial growth factor), factorul de creştere al nervilor - NGF (nerve growth factor), ş.a.

Factorii de creştere - reprezentaţi prin proteine sau glicoproteine - se fixează pe receptorii membranari, declanşând procese biochimice şi determinând intrarea celulei în ciclul celular, care se încheie cu diviziunea celulară (denumită mitoză în cazul celulelor somatice).

La eucariote membrana poate, de asemenea, să joace un important rol în creşterea şi diviziunea celulară. Această afirmaţie este susţinută de faptul că în culturile de celule au loc procese de creştere şi diviziune până la formarea unui "pat continuu". Apoi creşterea se opreşte, ajungându-se la aşa numita *inhibiţie de contact*. Se consideră că la originea inhibiţiei de contact se află un "contact exterior" între celule prin intermediul membranelor periferice ale acestora, urmat de inhibarea creşterii.

In biologia celulară şi moleculară se cunosc, de asemenea, substanţe vegetale, cum ar fi lectinele sau fitohemaglutininele (e.g.: concavalina A), care se fixează pe anumite celule, modificând creşterea acestora. Astfel, substanţele amintite pot stimula creşterea limfocitelor şi inhiba creşterea celulelor embrionare şi tumorale. De asemenea, intervin în aglutinarea hematiilor, aparţinând anumitor grupe sanguine.

Procesele creşterii celulare sunt dependente de fazele ciclului celular şi explicitate prin mecanismele cineticii celulare.

1.7.2.6. Bariere membranare ale celulelor

Prezentarea mai detaliată a problemei barierelor membranare - apelând la date care interesează biochimia, biologia celulară, biologia moleculară şi fiziologia - este necesară în scopul expunerii coerente, comprehensiunii şi inteligibilităţii aspectelor fizico-chimice ale problematicii referitoare la nutriţie, farmacologie şi toxicologie.

În acest sens se menţionează faptul că discutarea modului în care metaboliţii proveniţi din nutrienţi (principii nutritive) de aport exogen (nutriţia enterală şi/sau parenterală) şi exogen (procesele metabolice) intră în sistemele de micro- şi macro-transport la nivel de membrane celulare, permite o mai bună explicitare a bazelor fiziologice şi biochimice ale nutriţiei.

La aspectele specifice nutriţiei umane se adaugă şi problematica extrem de complexă şi actuală referitoare la xenobioticele cu potenţial toxicogen - substanţele contaminante decelate (tot mai frecvent) în produsele alimentare.

De asemenea, se are în vedere importanţa discutării problemei barierelor membranare celulare în relaţie cu xenobioticele de interes farmaceutic etc.

La nivelul membranei celulare se realizează transportul transmembranar al substanţelor, prin care se asigură un schimb perpetuu între mediile intracelular şi extracelular. În această manieră, membrana celulară controlează homeostazia biochimică a mediului intracelular în raport cu mediul extracelular, asigurând supravieţuirea celulei.

Privit în ansamblu, transportul transmembranar al substanţelor se poate defini prin *relaţia influx-eflux*. Astfel, prin influx se realizează pătrunderea substanţelor în celulă, iar prin eflux ieşirea substanţelor din celulă.

Particularităţile morfofiziologice şi topobiochimice ale membranelor biologice (biomembranelor) prezintă, în general, similitudini.

În biochimie, biologia moleculară şi fiziologia umană se discută despre tipuri de membrane biologice, în acest sens menţionându-se: a) membrana celulară tipică; b) membranele organitelor celulare; c) membrane tisulare specifice ţesutului epitelial, e.g.: endoteliul alveolar, epiteliul renal, mucoasa digestivă ş.a.; d) membrane tisulare specializate, e.g.: membrane sinaptice, membrane mielinice ş.a. (Benga, 1985; Kaufman et al., 1995; Hăulică et al., 1996; Gârban, 1999).

1.7.2.6.1. Sisteme de transport-generalităţi

Transportul prin membranele celulare se realizează, în funcţie de natura şi mărimea compuşilor prin două tipuri de sisteme, acreditate sub denumirile de: 1) sisteme de microtransport; 2) sisteme de macrotransport.

1. Sistemele de *microtransport* asigură tranzitul transmembranar al substanţelor prin două mecanisme:

a) *transportul pasiv* - care se realizează prin: α) difuziune; β) osmoză; γ) echilibrul Donnan;

b) *transportul activ* - care este asigurat de pompe active pentru electroliţi şi neelectroliţi şi se realizează: α) în contragradient de concentraţie; β) prin translocare de grup.

2. Sistemele de *macrotransport* interesând substanţele cu masă moleculară mai mare se realizează prin mecanisme specifice :

a) *endocitoza* - prin care se asigură *influxul* de substanţe în mediul celular. In cazul endocitozei se disting două tipuri de mecanisme prin care acced substanţele: pinocitoza şi fagocitoza

b) *exocitoza* - care contribuie la *efluxul* substanţelor din celulă spre mediul extracelular

BCU "ION CREANGĂ" UNIVERSITY LIBRARY

Integrarea sistemelor de micro- şi macrotransport în ansamblul morfofiziologic al celulei asigură menţinerea homeostaziei biochimice a mediului intracelular.

1.7.2.6.2. Sisteme de microtransport

Sistemele de microtransport asigură tranzitul transmembranar al moleculelor mici, e.g.: glucoză, uree etc. şi a unor ioni, e.g.: Na^+, K^+, Ca^{2+}, Mg^{2+} etc. prin transport pasiv şi transport activ.

1.7.2.6.2.1. Transportul transmembranar pasiv

Tranzitul transmembranar al moleculelor mici şi ionilor se realizează prin transport pasiv având la bază fenomene distincte: 1) difuziune, 2) osmoză, 3) echilibrul Donnan. La originea acestora se află modificări ale gradienţilor de concentraţie moleculară şi/sau ionică.

Experimentele efectuate cu membrane semipermeabile (e.g.: foi de celofan) în scopul separării amestecului proteine – NaCl a permis înţelegerea şi explicitarea procesului de dializă. Membrana utilizată, permeabilă pentru molecule mici (e.g.: NaCl) şi impermeabilă pentru proteine a permis explicarea fenomenului fizic cunoscut sub numele de "transport pasiv". Acest transport, caracteristic anumitor substanţe prezente în celule, este studiat cu acurateţe în fiziologie şi biochimie.

Se vor prezenta, în continuare, căile specifice pentru transportul pasiv, i.e.: 1) transportul prin *difuziune*; 2) transportul prin *osmoză*; 3) transportul condiţionat de *echilibrul Donnan*.

1. Transportul prin difuziune

Difuziunea ca şi fenomen fizico-chimic, rezidă în mişcarea particulelor de ioni sau molecule în soluţie. În general se admite că particulele de substanţă aflate într-un solvent sunt în continuă mişcare (mişcarea browniană). Datorită mişcărilor continue şi întâmplătoare are loc o repartizare egală a substanţelor (solviţilor) în solvent, care conduce la egalizarea concentraţiei. Procesul de mişcare prin care se realizează egalizarea concentraţiei este cunoscut sub denumirea de difuziune.

În cazul difuziunii particulelor printr-o membrană poroasă (in vitro), ca şi în cazul difuziunii prin membrana celulară (in vivo), este posibilă aplicarea legii lui Fick.

BCU "CAROL I" CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Difuziunea transmembranară este complexă pentru faptul că în sistem se află particule coloidale mici care concură spontan la egalizarea concentraţiei fazei disperse.

Legea Fick arată că numărul de moli (n) al substanţei care difuzează în unitatea de timp (t) este dependent de coeficientul de difuziune, unitatea de suprafaţă şi gradientul de concentraţie (negativ - concentraţia fiind în scădere). Legea Fick se poate reda prin relaţia:

$$\frac{dn}{dt} = D - S\left(-\frac{dc}{dx}\right)$$

în care: D - coeficient de difuziune
S - suprafaţa (secţiunea) prin care are loc difuziunea
dc/dx - gradient de concentraţie

Valoarea dc/dx se prezintă ca un gradient de concentraţie. Dacă acest gradient de concentraţie este considerat constant, se poate scrie relaţia:

$$\frac{dc}{dx} = c_2 - \frac{c_1}{x}$$

valabilă în cazul în care două soluţii de concentraţie c_1 şi c_2 sunt separate printr-o membrană, difuziunea producându-se astfel încât scăderea de concentraţie se menţine aceeaşi în fiecare moment.

În acest caz relaţia dată de legea Fick poate fi integrată, rezultând:

$$n = D \cdot S \cdot c_2 - \frac{c_1}{x} \cdot t$$

Apelând la această relaţie, prin măsurarea cantităţii de substanţă difuzată (n) în timpul (t) se poate calcula coeficientul de difuziune D.

Se menţionează că în fiziologie se utilizează termenul generic de "flux" reprezentând deplasarea soluţiei în unitatea de timp care este redat spre exemplu în mM/minut. Fluxul (J) este definit prin legea Fick a difuziunii (Rhoades şi Pflanzer, 1992). Pentru aceasta în fiziologie se utilizează expresia:

$$J = -D \cdot S \cdot \frac{dc}{dx}$$

termenii având sensurile cunoscute mai sus.

BCU "IOAN CREANGĂ" UNIVERSITY LIBRARY

Gradientul de concentraţie (dc/dx) este explicitat - aşa cum s-a arătat - prin modificarea concentraţiei relative odată cu modificarea distanţei. Semnul negativ semnifică scăderea concentraţiei odată cu trecerea de la o concentraţie mai mare la o concentraţie mai mică prin tranzitul transmembranar.

Difuziunea - ca sistem de microtransport pasiv este asigurată de două categorii de structuri membranare cu rol în tranzitul substanţelor hidrosolubile reprezentate prin micromolecule (molecule mici) şi ioni, i.e: canale ionice; transportori transmembranari.

Difuziunea, ca transport transmembranar pasiv, se realizează prin două mecanisme: A) difuziunea liberă; B) difuziunea mediată.

A) Difuziunea liberă

Reprezintă un proces fizic în care transportul transmembranar al metaboliţilor cu molecula mică se realizează de la o concentraţie mai mare (c_1) spre o concentraţie mai mică (c_2), deci în acest caz $c_1 \longrightarrow c_2$ (în condiţia $c_1 > c_2$). Structurile membranare prin care se realizează acest transport sunt canalele ionice.

Transportul pasiv transmembranar este asigurat de molecule proteice cu dispunere transmembranară, cunoscute sub denumirea de *"porine"*. Acestea se pot constitui în "formaţiuni canaliculare moleculare" care străbat membrana celulară (Benga, 1985). Moleculele proteice amintite mai sus prezintă structuri asemănătoare cu proteinele din matrice (Rosenbusch, 1974). Porinele prezintă importanţă morfofiziologică pentru activitatea întregii celule.

Viteza de transport (v) este dependentă de diferenţa de concentraţie (Δc), aceasta exprimându-se ca o funcţie, prin relaţia:

$$v = f(\Delta c)$$

Formaţiunile canaliculare transmembranare, numite cu un termen generic de "canale ionice", sunt constituite din proteine integrate în structura membranei plasmatice. Canalele ionice traversează membrana sub forma unor "tunele", asigurând tranzitul prin difuziune liberă a ionilor proveniţi din molecule mici solubile în apă.

În prezent problema proteinelor-canal, a izolării, purificării şi studiului proprietăţilor acestora constituie un domeniu intens studiat. S-au decelat proteine canal: hidrofobe - dispuse înspre interiorul canalului (zona traversată) şi hidrofile - dispuse spre exterior şi spre extremităţile (intra- şi extracelulară) canalului. Deschiderea canalelor este condiţionată de diverşi factori fizici (mecanici, electrici) sau chimici. Mecanismele de tip "barieră" a acestor canale nu sunt elucidate.

BCU CLUJ-NAPOCA UNIVERSITY LIBRARY

B) Difuziunea mediată

Se produce în prezenţa şi sub acţiunea unor sisteme transportoare (T) de natură protidică (numite cu un termen generic "permeaze"), aflate la nivelul biomembranelor. În acest proces, transportul are loc în gradient de concentraţie, recte de la concentraţie mai mare (c_1) la concentraţie mai mică (c_2), cu participarea sistemului de transport (T).

Transportul substanţei S implică faze intermediare reversibile, ca: asocierea, translocarea (semnificând deplasarea produsului asociat) şi disocierea. Aceste faze se pot reprezenta astfel:

$$S + T \xrightarrow{\text{asociere}} ST \xrightarrow{\text{translocare}} TS$$

$$TS \xrightarrow{\text{disociere}} T + S$$

În difuziunea mediată, transportorii (i.e. permeazele) manifestă specificitatea pentru substanţa transportată, datorită acesteia crescând viteza de difuziune. O altă caracteristică a difuziunii mediate este stereospecificitatea (e.g.: aminoacizii din seria D şi L tranzitează cu viteze diferite membrana celulară).

Transportorii - sunt reprezentaţi de proteine membranare cu zone hidrofobe parţial integrate în stratul dublu lipidic al membranei plasmatice. Aceste proteine - zonal integrate - măresc viteza de transport a substanţelor hidrosolubile care tranzitează, în influx sau eflux, membrana celulară.

Sub raport biochimic şi citofiziologic transportorii contribuie atât la transportul pasiv de tipul difuziunii mediate cât şi la transportul activ (în care intervin enzime).

Un exemplu tipic de transportor este "transportorul de glucoză" - reprezentat de o moleculă proteică care poate transporta cca. 104 molecule de glucoză pe secundă. Acest transportor are câteva caracteristici principale: fluxul tranzitului este condiţionat de concentraţia glucozei, fiind mai mare decât în cazul difuziunii simple; cinetica fluxului este condiţionată enzimatic - deci nu respectă legea Fick; cinetica este condiţionată, de asemenea, de substrat - prezenţa glucozei (reprezentând substratul) pe interfaţa opusă direcţiei de tranzit, accelerează fluxul către interfaţa respectivă; transportul transmembranar poate fi blocat de substanţe care sunt "analogi structurali" şi (din acest considerent) pot deveni inhibitori competitivi.

Mecanismul de transport nu este elucidat. Din acest acest motiv s-au propus diverse modalităţi de explicitare: α)transportorul (molecula transportoare), după fixarea

moleculei transportate, realizează o turnură de 180° spre a se realiza tranzitul şi descărcarea pe interfaţa opusă a membranei - mecanism tip "flip-flop"; β)transportorul, după fixarea moleculei transportate, este supus unor modificări conformaţionale succesive în cursul cărora se realizează în mod "propulsat" tranzitul moleculei spre interfaţa opusă a membranei - mecanism tip "squirting" (engl.squirt - a ţâşni un lichid).

Cu referire la mecanismul de transport, şi îndeosebi a perspectivei de elucidare a compoziţiei proteinelor transportoare, se face precizarea că studiul temeinic al acestora prin izolare, purificare, secvenţializare a devenit posibilă odată cu dezvoltarea tehnologiei DNA recombinant.

2. Transportul prin osmoză

Osmoza este caracterizată prin fenomenul de difuziune transmembranară a moleculelor de apă. În această accepţie osmoza poate fi considerată ca o "difuziune acvodependentă". Traversarea apei prin bariera membranară este determinată (cauzată) de diferenţa de concentraţie a compuşilor hidrosolubili existenţi între mediile intra- şi extracelular.

Pentru explicitarea fenomenului vom considera cazul unei membrane semipermeabile care separă două soluţii apoase. Moleculele solventului (apei) se deplasează din compartimentul cu concentraţie mai mică (e.g. pahar Berzelius) spre compartimentul cu concentraţie mai mare (e.g. tubul osmoscopului). Un astfel de model este prezentat în fig.1-19, redând tranzitul printr-o membrană permeabilă a apei spre o soluţie de sucroză.

Fig. 1-19. Osmoza - mecanismul de tranzit transmembranar;
(a) starea iniţială; (b) starea finală

BCU IASI/CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

În studiul osmozei s-a definit noţiunea de concentraţie osmotică exprimată prin unităţi specifice denumite osmoli (abreviate Osm). În domeniul biochimiei, biologiei moleculare şi fiziologiei se utilizează mărimea de miliosmoli (mOsm).

Există o relaţie între osmolaritate notată prin Osm şi molaritate - notată prin M. Aceasta se poate reda astfel:

$$Osm = n \cdot M$$

în care: n - numărul de particule
M - molaritatea soluţiei

Se remarcă faptul că valoarea n reprezintă numărul de particule - molecule sau ioni (rezultaţi prin disociere), care se află în mediul apos.

Studiul osmozei are în vedere concentraţia substanţei (e.g.: molaritate, molalitate etc.), dar şi numărul de particule (n) eliberate în cursul hidrolizei. Se exemplifică, în acest sens, că sucroza, glucoza ş.a. nu disociază în soluţie apoasă, spre deosebire de NaCl, $CaCl_2$ ş.a. la care prin disociere în soluţie se dublează numărul de particule. Practic, în cazul glucozei (care are n=1) la concentraţia de 60 mM/L are osmolaritatea de 60 mOsm/L. Spre deosebire de aceasta, NaCl (care are n=2) la concentraţia de 60 mM/L are osmolaritatea de 120 mOsm/L. In cazul $CaCl_2$ (pentru care n=3) la concentraţia de 60 mM/L în urma disocierii complete se realizează o osmolaritate de 180 mOsm/L. Din aceste exemple se observă că atât moleculele cât şi ionii sunt particule osmotic active.

În sistemele biologice proprietăţile fizico-chimice se evaluează şi prin *presiunea osmotică*. Într-un anumit mediu, in vitro sau in vivo, presiunea osmotică se defineşte prin particularităţile hidrolitice ale solviţilor fiind direct proporţională cu concentraţia acestora.

Valoarea presiunii osmotice (π) se redă printr-o relaţie relativ simplă, care are în vedere concentraţia (c) substanţelor solvite şi apelează la legea van't Hoff.

Expresia uzuală este:

$$\pi = R \cdot T \cdot c$$

în care: R - constanta gazelor ideale (R=8310 J/kmol K)
T - temperatura absolută (în grade K)
c - concentraţia (M/L, mM/L sau mol/L)

În cazul când T este constantă - deci nu există o modificare de temperatură- presiunea osmotică se poate raporta direct la osmolaritate.

Osmolaritatea soluţiilor şi/sau a unor lichide biologice se poate determina direct prin utilizarea unui osmometru cu punct de îngheţare. Majoritatea osmometrelor sunt calibrate astfel încât pot reda, la citire, valoarea în Osm sau mOsm.

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Punctul de îngheţare al apei pure scade când sunt prezente substanţe dizolvate (solviţi), iar mărimea acestei scăderi este direct proporţională cu cantitatea totală a solviţilor prezenţi.

Evaluarea osmolarităţii în raport cu stările izoosmotice (normale) se face în situaţiile în care osmolaritatea creşte - hiperosmolaritate, sau scade - hipoosmolaritate.

În fiziologie şi fiziopatologie se explorează presiunea osmotică a plasmei sanguine umane. Exprimarea acesteia se face în mOsm/L. S-a constatat că presiunea osmotică normală a plasmei umane este 310 mOsm/L, evaluându-se în raport cu punctul crioscopic de $^{-}0,56^{o}C$. Substanţele prezente în sânge dezvoltă o presiune osmotică parţială (independentă), fapt care explică valoarea mare a presiunii din plasmă şi, în general, din lichidele biologice.

În experimentele din fiziologie, în clinică (nutriţia parenterală, farmacoterapie) se utilizează diverse soluţii izotonice. Soluţiile care prezintă presiune osmotică mai mare decât plasma se numesc hipertonice, iar acelea cu presiune osmotică mai scăzută hipotonice.

În evaluarea presiunii osmotice se are în vedere faptul că o parte a acesteia este datorată proteinelor, reprezentând aşa numita presiune coloid-osmotică (oncotică). Proteinele plasmatice sunt reprezentate de molecule mari (cu masa moleculară de 44.000-1.300.000 Da) cu diverse configuraţii (aranjamente ale atomilor) de la forme sferice, e.g. β-lipoproteine, până la forme elipsoidale, e.g. albumine, globuline. Aceste proteine plasmatice sunt conside-rate coloizi. Valoarea presiunii coloid-osmotice este de 25-30 mmHg reprezentând un important factor pentru schimburile între lichidele intravascular şi interstiţial. Presiunea oncotică este importantă pentru schimburile hidrice din anumite teritorii, e.g.: vase capilare - glomerul renal (în rinichi), vase capilare - lichid interstiţial (în muşchi).

Se estimează că cca. 99,5% din valoarea presiunii osmotice totale a plasmei sanguine este dată de moleculele mici cum ar fi electroliţii, ureea, glucoza ş.a. care trec prin membranele celulare odată cu apa. În general se poate afirma că homeostazia biochimică - care defineşte statusul normal al substanţelor din organism - este dependentă de presiunea osmotică a plasmei.

3. Transportul condiţionat de echilibrul Donnan

Echilibrul Donnan reprezintă un fenomen de difuziune transmembranară condiţionată. Acesta se produce în cazul în care de o parte a membranei există un ion non-difuzibil (numit adesea şi "ion non-permeabil") în raport cu membrana.

Prin echilibrul Donnan se poate realiza echilibrarea electrică a particulelor de o parte şi alta a membranei.

Studiul echilibrului Donnan s-a efectuat pe membrane selectiv permeabile evaluându-se forţele de difuziune şi forţele electrostatice, care contribuie la stabilirea echilibrului final. Astfel, s-au luat două soluţii dispuse în acelaşi vas, dar separate printr-o membrană selectiv permeabilă (fig.1-20). În starea iniţială de o parte a fost o soluţie de proteine salifiate cu ioni K^+ obţinându-se aşa numitul "proteinat de potasiu" notat KPrt (care disociază în ioni K^+ şi Prt^-), iar de altă parte a fost o soluţie de KCl (care, de asemenea, disociază). Macroionii Prt^- (care de fapt sunt polimacroanioni) nu pot tranzita membrana, astfel că pentru stabilirea echilibrului final participă doar microionii Cl^- şi K^+. În stadiul final se stabileşte echilibrul doar ca urmare a tranziţiei microionilor.

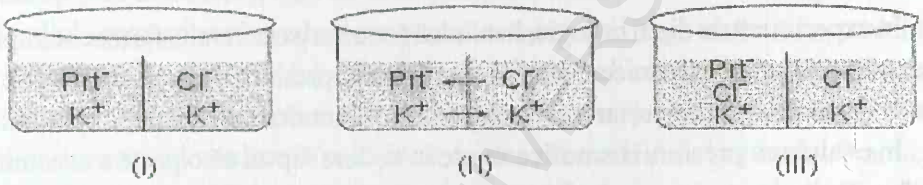


Fig.1-20. Realizarea echilibrului Donnan (explicaţii în text):
(I) stare iniţială; (II) stare tranzitorie; (III) stare finală

Acest mecanism, caracteristic şi definitoriu pentru echilibrul Donnan, a făcut posibilă explicarea fenomenelor electrochimice care se produc la nivel ionic în cazul membranei cu permeabilitate selectivă. Studiul acestor fenomene s-a făcut de către Nernst (1908) şi a stat la baza emiterii ipotezei asupra existenţei unui "potenţial de repaus" al membranei celulare, important în studiul excitabilităţii neuromusculare.

La echilibru, între cele două feţe ale membranei, se stabileşte o diferenţă de potenţial, generată de o anumită specie ionică dată. Acest potenţial, notat prin E, poate fi definit prin legea lui Nernst, redată prin relaţia:

$$E = \frac{RT}{zF} \ln \frac{c_i}{c_e}$$

în care: R - constanta universală a gazelor
T - temperatura absolută (grade K)
Z - valenţa ionului
F - sarcina (96.000 coulombi)
c_i - concentraţia intracelulară a ionului
c_e - concentraţia extracelulară a ionului

BCU IASI/CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Expresia nernstiană a diferenței de potențial, dată mai sus, atestă faptul că repartiția la echilibru a ionilor pe fețele internă și externă ale membranei celulare determină apariția unui "potențial de repaus".

Ionii non-difuzibili prin membrana celulară au fost investigați experimental. Astfel, anionii organici ai proteinelor macromoleculare - dispuși intracelular - realizează starea de echilibru prin tranzitul transmembranar al ionilor anorganici - îndeosebi ionul Cl^-. Echilibrul se va realiza în condițiile participării ionilor K^+ și Cl^- care pot traversa membrana. În final, la fața internă a membranei celulare se vor afla anionii proteinei (Prt^-), anionii Cl^- și cationii K^+, iar la fața externă anionii Cl^- și cationii K^+ realizând raporturi de concentrație egale.

1.7.2.6.2.2. Transportul transmembranar activ

Mecanismele specifice pentru transportul transmembranar activ au drept caracteristică faptul că tranzitul prin biomembrane se realizează cu consum de energie. Acest transport se poate produce pe două căi : A) *în contragradient de concentrație*; B) *prin translocare de grup*. Ambele căi necesită energo-activare.

Evaluarea transportului transmembranar activ are în vedere câteva caracteristici principale:

- necesită aport energetic - în raport cu transportul pasiv, la realizarea transportului activ se utilizează energia furnizată prin consumul de adenozintrifosfat (ATP);
- are viteza de tranzit dependentă de concentrația substanței. Astfel, spre exemplu, creșterea concentrației substanței prezente în exteriorul celulei, determină o creștere a penetrației (aceasta până la o anumită limită - viteză maximă, care nu poate fi depășită);
- interpretarea fenomenului se face în accepția existenței unui anumit număr de "zone de penetrație" transmembranară. Odată cu creșterea concentrației substanțelor, intră în funcție un număr mai mare de astfel de zone, crescând viteza de tranzit. În cazul când toate aceste zone sunt mobilizate se ajunge la viteza maximă, care nu poate fi depășită chiar dacă mai crește concentrația substanței;

În continuare se discută căile specifice pentru transportul transmembranar activ: a) transportul în contragradient de concentrație; b) transportul prin translocare de grup.

A. Transportul în contragradient de concentrație

În cazul transportului în contragradient de concentrație se remarcă faptul că o substanță poate trece de la o concentrație mai ridicată a unui compartiment spre o concentrație mai scăzută a altui compartiment.

Transportul se realizează cu consum de energie, fiind direcţionat de la concentraţie mică (c_2) spre concentraţie mare (c_1). Deci, în acest tip de transport se realizează tranzitul de la $c_1 \rightarrow c_2$ (în condiţia $c_1 > c_2$).

Astfel, în condiţiile date, sistemul transportor (T) de natură proteică sau lipoproteică - cuplează componente energizante de tip fosfat - legat macroergic ($\sim P_i$), având ca sursă de energie adenozin trifosfatul (ATP).

B. Transportul prin translocare de grup

Această cale de transport implică constituirea unui derivat al substanţei iniţiale. Derivatul se formează cu consum de energie (e.g. preluarea unei grupări fosfat), condiţie în care poate traversa biomembrana în contragradient de concentraţie.

Un astfel de transport se realizează, spre exemplu, în cazul compuşilor glucidici din clasa hexozelor:

$$\text{hexoza} + \text{ATP} \xrightarrow{\textit{fosfat transferaza}} \text{hexozo-fosfat} + \text{ADP}$$

În reacţie sursa de energie este ATP (notat şi $AMP\sim P_i\sim P_i$ sau $ADP\sim P_i$). După cedarea unei grupări fosfat, ATP se transformă în ADP. La procesul de translocare participă şi o enzimă: fosfat-transferaza, care transferă gruparea fosfat pe o moleculă de hexoză (e.g.: glucoză, fructoză ş.a.).

Experimental s-a constatat că prin membranele biologiće, cum ar fi membranele celulare şi mitocondriale, pot penetra ioni şi molecule mici printr-un proces de transport activ. Problema transportului activ se poate discuta şi exemplifica în cazul ionilor şi a metaboliţilor cu molecula mică.

a) Tranzitul ionilor de Na^+ şi K^+

Distribuţia cationilor de Na^+ şi K^+ prezintă caracteristici bine definite. Astfel, în celulă predomină K^+, iar în mediul extracelular Na^+. La nivelul membranei celulare funcţionează aşa numita "pompă Na - K", care asigură eliminarea Na^+ din celulă şi accesul K^+ în celulă.

Gradientul de concentraţie se menţine constant, graţie unei enzime membranare denumită *ATP-aza Na, K dependentă*, care descompune hidrolitic ATP formând ADP şi fosfat (P_i), furnizându-se astfel energia pompei. Purificarea ATP-azei Na, K dependentă, a relevat faptul că aceasta este o proteină constituită din patru subunităţi: două de tip α - cu masa moleculară de 94.000 Da; două de tip β - cu masa 50.000 Da. Dintre acestea, subunităţile α, conferă rol catalitic enzimei.

În principiu, gradientul ionic creează o diferenţă de potenţial între interiorul şi

exteriorul celulei. Fenomenul este mai bine explicitat pentru celule nervoase (neuroni). În cazul stimulării neuronului se modifică permeabilitatea de membrană, astfel că gradientul ionic scade, ceea ce creează o variație de potențial, care reprezintă curentul de acțiune.

b)Tranzitul ionilor de Ca^{2+} și Mg^{2+}

Concentrațiile celulare ale cationilor Ca^{2+} și Mg^{2+} sunt, de asemenea, caracteristici bioconstituționale. Acestea se asociază activității unei alte enzime specifice denumită *ATP-aza Ca, Mg dependentă*. Astfel, spre exemplu, concentrația Ca^{2+} este de 10.000 ori mai mică în celulă comparativ cu mediul extracelular.

Celula musculară are o rețea de canalicule fine (reticul sarcoplasmatic), care conține o rezervă de Ca^{2+}, necesară contracției musculare. Astfel că în reticul poate exista și o pompă de Ca^{2+} (activă în relație cu acetilcolina), care utilizează ATP-aza.

În alte celule rezerva de Ca^{2+} și Mg^{2+} se află în reticulul endoplasmatic și se constituie grație ATP-azei Ca, Mg dependente.

c) Tranzitul metaboliților

Penetrația diverșilor metaboliți - în speță "molecule mici" - beneficiază de sisteme de transport specifice. Spre exemplu, sistemele de transport diferă pentru glucoză, lactoză, diverse grupe de aminoacizi etc.

Sistemele de transport sunt sensibile la stereoizomeria bioconstituenților. Stereodependența tranzitului poate fi explicată în cazul glucozei, prezentă sub formele sterice D și L. Dintre acestea L-glucoza poate fi sintetizată în laborator, dar nu se află în celule. Doar D-glucoza, este prezentă în celule, fiind singurul izomer optic pentru care există un transport activ în sistemele biologice.

1.7.2.6.3. Sisteme de macrotransport

În cadrul sistemelor de macrotransport se pot include: 1) endocitoza; 2) exocitoza. Aceste sisteme prezintă mecanisme caracteristice prin care se realizează transportul macromoleculelor aflate în soluție și chiar înglobarea microorganismelor.

1.7.2.6.3.1. Endocitoza

Endocitoza reprezintă o formă de transport transmembranar specifică pentru tipul sistemelor de macrotransport.

În endocitoză se distinge, inițial, o etapă de internalizare (invaginare) a membranei

celulare. După aceasta, într-o etapă secundă, se constituie fagosomul care transportă substanţele preluate din mediul extracelular în cursul etapei de internalizar (fig.1-21). In continuare, prin dehiscenţa fagosomului, conţinutul acestuia este preluat de un lizosom primar - în care există doar enzime digestive.

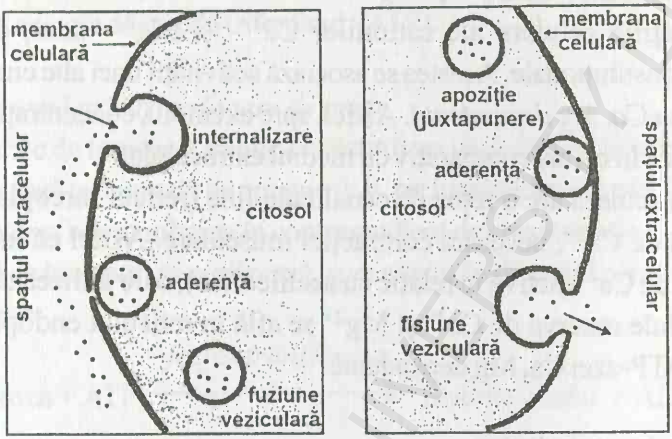


Fig. 1-21. Transportul transmembranar prin endocitoză şi exocitoză (explicaţii în text)

În timpul preluării se realizează o aşa numită "fuziune" de tip fagosom - lizosom, în cursul căreia substanţele (e.g.: molecule de nutrienţi, molecule de medicamente) sunt transportate spre a fi digerate. Etapele descrise relevă influxul substanţelor la nivel celular.

La acest proces participă şi complexul Golgi aflat în citosol în proximitatea lizosomilor.

Transportul prin endocitoză este caracteristic şi pentru celule. Endocitoza include, de fapt, două procese distincte:

a) fagocitoza - proces caracteristic pentru leucocite şi macrofage, care rezidă în înglobarea microorganismelor (bacterii) sau a unor fragmente celulare de către leucocite. Acest proces este important din punctul de vedere al imunochimiei.

b) pinocitoza - proces prin care sunt preluaţi, din mediul extern, compuşi macromoleculari în soluţie, prin emiterea unei lame ectoplasmice - rezultată din membrana plasmatică sau prin constituirea unei invaginaţii tubuliforme pentru preluarea produselor (e.g. picături de lichid).

Endocitoza se realizează prin "inclavarea" produselor luate din mediul exterior celulei. Asupra acestora acţionează enzimele amilo-, lipo- şi proteolitice eliberate, după dislocarea membranei lizosomale, în mediul intern (citoplasma).

1.7.2.6.3.2. Exocitoza

Exocitoza constituie o formă de transport transmembranar caracteristică, de asemenea, pentru tipul sistemelor de macrotransport. Sub raport funcţional exocitoza, în fiziologie, este caracterizată ca un "proces revers" al endocitozei.

Mecanismul exocitozei urmăreşte etapele consecutive ale efluxului substanţelor din celulă (fig.1-21). În cazul exocitozei iniţierea procesului se produce la nivel de lizosom secundar. Un astfel de lizosom se constituie după "fuziunea" fagosom-lizosom. În lizosomul secundar se află enzime dar şi molecule preluate în cursul internalizării şi constituirii fagosomului. Astfel de molecule - cunoscute sub denumirea generică de "substrat" - interacţionează cu moleculele de enzime.

În urma interacţiei substrat-enzimă se constituie vezicula (vacuola) digestivă, care se orientează spre membrana plasmatică a celulei. O parte din conţinutul veziculei digestive se absoarbe în citosol. În etapa finală conţinutul vacuolei digestive este eliminat la nivelul fluidului extracelular. Odată cu acesta se elimină şi produse elaborate de reticulul endotelial şi de complexul Golgi, care participă la constituirea veziculei digestive.

Membrana veziculei, după eliminarea conţinutului acesteia, la finele exocitozei se integrează membranei plasmatice. Astfel, în fiziologia celulară s-a acreditat noţiunea de "reciclare membranară" pentru membrana lizosomală.

În literatura de specialitate se întâlneşte uneori şi termenul de "***emeiocitoză***", care este utilizat pentru a defini deversarea produselor de sinteză ale celulei în mediul extracelular. În această manieră se discută obişnuit eliberarea produselor de excreţie glandulară în cazul hormonilor.

1.7.2.6.3.3. Specificul sistemelor de macrotransport

Tranzitul macromoleculelor se realizează după fixarea acestora pe membrana plasmatică. Compuşii cu structură macromoleculară penetrează în interiorul celulei prin procesul denumit endocitoză. Sistemele de macrotransport asigură tranzitul pentru proteine, hormoni, factori de creştere, transferine (care transportă fier), lipoproteine (din care unele sunt implicate în transportul de colesterol). Acest tranzit este discutat în contextul evidenţierii rolului cla-trinelor. Procesul de transport trans-membranar al proteinelor spre interiorul celulei este iniţiat, aşa cum s-a arătat, prin "internalizare" (fig.1-22).

Diversele proteine sunt reţinute pe membrana celulară la nivelul receptorilor. Receptorii din membrană - dispuşi în anumite regiuni ale acesteia - se află în diferite

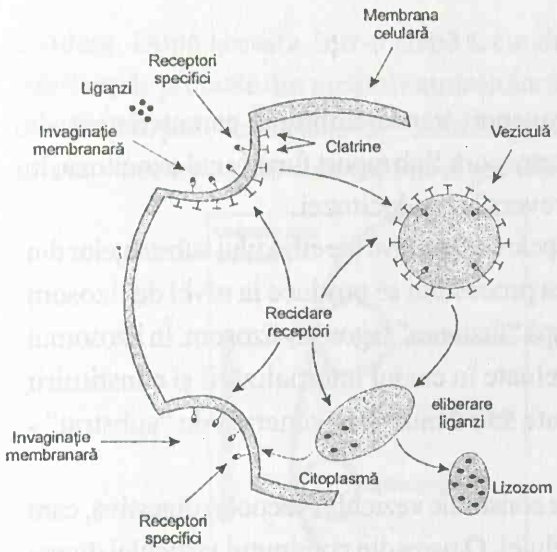


Fig. 1-22. Tranzitul macromoleculelor în celulă

invaginaţiuni (engl. coated pits) la nivelul cărora vin în contact cu liganzii constituiţi din macromolecule proteice. La nivelul invaginaţiunilor se disting formaţiuni constituite din numeroase proteine identice denumite clatrine. Macromoleculele proteice, mai mult sau mai puţin complexe, se fixează pe receptori specifici formându-se astfel ansamblul receptor-proteine.

Se produce apoi invaginarea "sistemului transportor" cu formarea unei vezicule. În continuare are loc separarea proteinelor de receptori prin scizionarea veziculei. O parte a veziculei, care conţine liganzii proteici, se dirijează spre lizosomi, unde se vor distruge proteinele cu eliberarea unei molecule mici sau a unor substanţe cu care acestea sunt combinate (e.g.: colesterol, vitamine, fier etc.). Secunda parte a veziculei, conţinând receptorii moleculari, se orientează spre membrana celulară, unde receptorii sunt reactivaţi (în cadrul unui proces de reciclare) la nivelul membranei celulare.

În această manieră diverşi hormoni, factori de creştere şi alţi compuşi - urmând calea generală descrisă - nu sunt distruşi, rămânând în celulă.

1.7.2.7. Matricea extracelulară

Matricea extracelulară este constituită din molecule care aparţin la două subclase de substanţe: glicozaminoglicani (GAG) şi proteine fibrilare. Aceste molecule sunt sintetizate în interiorul celulei de unde, după tranzitarea membranei, sunt eliberate, în spaţiul extracelular (Stevens şi Lowe, 1992).

Diverşii compuşi, uneori aparţinând claselor mai sus menţionate, intervin în interacţiunea celulă-matrice extracelulară.

In general, ţesuturile de susţinere au o reţea largă de celule suport care prezintă matrice extracelulară abundentă. In matricea extracelulară, din punct de vedere topobiochimic s-au decelat proteine fibrilare dispuse într-un gel hidratat de

glicozaminoglicani. Celulele apartinând altor ţesuturi (e.g.: celule epiteliale, celule contractile) sunt fixate la ţesuturile de susţinere prin "joncţiuni de ancorare" care vizează matricea extracelulară.

1.7.2.7.1. Constitutia matricei extracelulare

Constituenţii principali ai matricei extracelulare sunt: A) glicozaminoglicani (majoritatea sulfataţi) - care se pot lega de proteine formând proteoglicani; B) proteine fibrilare- diferite prin structura chimică şi activitatea biologică. Aceşti constituenţi se discută în continuare.

A. Glicozaminoglicanii (GAG)

Glicozaminoglicanii prezenţi în matrea extracelulară sunt formaţi din catene poliglucidice neramificate care sunt constituite din 70-200 "unităţi diglucidice" repetitive (Bloom şi Fawcett, 1986; Stevens şi Lowe, 1992; Stryer, 1996). Catenele de GAG au câteva proprietăţi caracteristice:

- încărcătura negativă crescută datorită prezenţei în unitatea diglucidică repetitivă a unei monoaminoglucide, i.e.: N-acetilglicozamina; N-acetilgalactozamina. Se mai remarcă faptul că o seamă de compuşi sunt sulfataţi (conţin gruparea sulfonică $-HSO_3^-$), iar o parte se află sub formă de acizi uronici (conţin gruparea carboxilică $-COO^-$) ;
- capacitatea crescută de reţinere a cationilor metalici M^{n+} (e.g.: Na^+, Ca^{2+}, Mg^{2+} etc.) şi a apei, care vor contribui la menţinerea statusului morfologic al ţesutului. Prezenţa cationilor şi a apei reţinuţi de GAG, reduce efectul forţelor compresive şi previn deformarea ;
- comportamentul hidrofil puternic datorită căruia pot genera structuri compactate. Acestea determină pentru ansamblul moleculei o conformaţie spiralată permanent deschisă ;
- posibilitatea de-a se lega de proteine şi de-a forma astfel "proteoglicani" - molecule mari care conferă capacitate de hidratare crescută pentru matricea extracelulară.

In funcţie de structură şi de distribuţia în ţesuturi GAG se grupează în patru tipuri de compuşi: 1) *condroitin sulfat şi dermatan sulfat*; 2) *heparin sulfat şi heparină*; 3) *keratan sulfat*; 4) *acid hialuronic*.

Dintre acestea primele trei tipuri sunt GAG sulfataţi (de fapt numirea corectă ar fi de GAG sulfonaţi şi conţin gruparea $-HSO_3$) şi se pot lega de proteine dând naştere la proteoglicani. Ultima clasă este reprezentată prin acidul hialuronic care nu este sulfatat şi nu se leagă de proteine.

In general se estimează că încărcătura chimică şi organizarea sterică a GAG şi a proteoglicanilor formaţi din GAG, facilitează difuzia selectivă a diferitelor molecule probabil prin variaţia mărimii zonelor de tranzit din matricea extracelulară.

In organism GAG sunt distribuiţi natural în cartilagii, ligamente, tendoane, vase sanguine, membrana bazală a unor ţesuturi (e.g.: pulmon, artere); discuri intervertebrale.

B. Proteinele fibrilare

In matricea extracelulară proteinele fibrilare existente diferă prin structura chimică şi activitatea biologică. Acestea sunt reprezentate de: *colagen, fibrilină, elastină, fibronectină* (Rawn, 1989 ; Stevens şi Lowe, 1992; Gârban, 1996).

Colagenul - este proteina fibrilară cu cea mai largă răspândire în organismele maiferelor. Molecula de colagen are lungimea de 300 nm şi diametrul de 1,4 nm. Este constituită din trei lanţuri polipeptidice de tip alfa-helix. Se află în toate organele, dar mai ales în piele, cartilagii, ligamente, tendoane, perete vascular, oase etc.

Fibrilina - este o glicoproteină specifică *microfibrilelor extracelulare*. Are un diametru de 8-12 nm şi este unul din constituenţii fibrelor elastice din matricea extracelulară. A fost decelată în compoziţia matricei provenită din glomeruli renali, fibre de susţinere a cristalinului ocular, din splină, pulmoni, pereţii vaselor sanguine etc.

Microfibrilele extracelulare - cu conţinut de fibrilină - mediază "adezivitatea" dintre componenţii matricei extracelulare.

Elastina - este o proteină hidrofobă care se asamblează în filamente prin cross-linking. Este principalul component al *fibrelor elastice*. Elastina este sintetizată în fibroblaste.

Fibronectina - este o glicoproteină multifuncţională (GPM), care poate exista sub trei forme. Aceste forme sunt: 1) GPM plasmatică circulantă; 2) GPM care se ataşează temporar la suprafaţa diverselor celule; 3) GPM prezentă în fibrile insolubile ca parte formatoare a matricei celulare (în aceasta pot să apară legături intercatenare disulfidice).

In molecula fibronectinei se află o secvenţă de trei acizi aminaţi: - arginină - glicina - asparagina (-Arg-Gly-Asp-), care joacă un rol principal în recunoaşterea proteinelor din matrice.

Membrana celulară posedă receptori proteici specifici pentru fibronectină numiţi *integrine*. Integrinele aparţin unei clase de molecule cu rol în adeziunea celulară. Struc-

tural sunt constituite din două subunități proteice.

Importanța funcțională a fibronectinei rezidă în abilitatea acesteia de-a adera la diverși componenți celulari, e.g.: colagen, heparină, dar și la alte molecule cu proprietăți adezive în raport cu celula.

1.7.2.7.2. Interactiunea de tip celulă - matrice extracelulară

O prezentare, fie și generală, a problemelor referitoare la interacțiunea de tip celulă-matrice extracelulară impune cunoașterea unor noțiuni referitoare la: A) glico-proteinele structurale extracelulare; B) membrana bazală; C) adeziunea celulară la matricea extracelulară. Date referitoare la acestea vor fi prezentate succint în continuare.

A. Glico-proteinele structurale extracelulare

Interacțiunea dintre celule și matricea extracelulară este mediată de diverse *"glicoproteine structurale extracelulare"* cunoscute sub denumirea generică de *"proteine non-fibrilare"*. Intre proteinele *non-fibrilare*, denumite adesea și non-filamentoase, se menționează: *laminina, entactina și tenascina.*

Laminina - este o glicoproteină sulfatată prezentă, predilect în constituția membranelor bazale. Este produsă de celulele epiteliale și endoteliale. Această glicoproteină se leagă de receptori celulari specifici i.e. integrine, heparan sulfat, colagen (de tip IV) și de entactină.

Entactina - este o glicoproteină sulfatată prezentă, de asemenea, în constituția membranelor bazale. Se leagă de laminină. De fapt se presupune că entactina asigură legătura între laminină și colagen (de tip IV).

Tenascina - este o glicoproteidă extracelulară implicată în procesele de adeziune celulară. S-a decelat, în mod deosebit, în țesutul embrionar. Prezintă importanță majoră pentru migrația celulară și dezvoltarea sistemului nervos

B. Membrana bazală

Membranele bazale sunt considerate ca aranjamente specializate de proteine fibrilare și glicozaminoglicani din matricea extracelulară, care acționează ca interfețe între celulele parenchimatoase. Aceste membrane se asociază diverselor celule e.g. epiteliale, musculare etc.

În membranele bazale se află cinci componenți majori: colagenul (de tip IV), laminina, heparan sulfatul, entactina și fibronectina

BIBLIOTECA UNIVERSITY LIBRARY

Sub aspect funcţional (după Stevens şi Lowe, 1992) membrana bazală are trei atribute distincte:

- constituie o interfaţă de adeziune între celulele parenchimatoase şi matricea extracelulară;

- acţionează ca o "barieră de permeabilitate" în care există pori a căror mărime depinde de încărcătura şi aranjamentul spaţial al glicozaminoglicanilor din compoziţie.

- controlează, probabil, organizarea celulară şi diferenţierea prin interacţii mutuale între receptorii de pe suprafeţele celulare şi moleculele din matricea extracelulară.

Studiul ultrastructurii membranelor bazale s-a aprofundat cu ajutorul microscopiei electronice, iar referitor la compoziţie cu ajutorul histochimiei.

C. Adeziunea celulară la matricea extracelulară

În adeziunea celulară intervin şi alte glicoproteine, denumite cu un termen generic - molecule de adeziune celulară -CAM (Cell Adhesion Molecules) care au un rol esenţial în recunoaşterea reciprocă a celulelor de acelaşi tip.

În acest mod matricea extracelulară asigură o joncţiune specializată, intercelulară (ca o formă a chemotactismului). Astfel de procese prin care se asigură comunicarea şi cooperarea dintre celule, se întâlnesc în embriogeneză şi în morfogeneză. Molecule din grupa CAM prezintă o certă specifitate celulară, descrise fiind L-CAM din celulele epiteliale şi N-CAM din celule nervoase şi musculare.

1.7.3. CICLUL CELULAR

Cinetica celulară sau citocinetica interesează aspectele cronobiochimice şi cronofiziologice care se produc în cursul diviziunii celulare mitotice. Procesele se desfăşoară în cadrul unei succesiuni de perioade (faze), care constituie aşa numitul ciclu celular. În fig.1-23 se prezintă schematic ciclul celular la celule de mamifere (după Darnell et al, 1986). Acest ciclu cu durata de cca. 16 ore evidenţiază trei perioade distincte cu durata totală de 15 ore, denumite: presinteză (G_1); sinteză (S); postsinteză (G_2) şi o perioadă de mitoză (M) - cu durata de cca. o oră, care este urmată de diviziunea celulară.

Nucleul, parte esenţială a aparatului genetic, evidenţiază o structură diferită în funcţie de perioada (faza) ciclului celular.

Prin studii de citofotometrie şi microautoradiografie s-a conchis că există perioade distincte prin activitatea biologică:

– *presinteză (G_1)* - în care aparent nu se produce biosinteza DNA pentru reproducerea celulară, iar biosinteza RNA şi a proteinelor se produce normal

Fig. 1-23. Ciclul celular la eucariote (prezentare schematică)

(la finele periodei G_1 se declanşează biosinteza DNA);

– *sinteză (S)* - în cursul căreia se produce sinteza activă a DNA, cantitatea acestuia dublându-se (corespunzând la 4 n cromosomi);

–*postsinteză (G_2)* numită şi premitotică - caracterizată prin faptul că biosinteza DNA încetează, iar biosinteza RNA şi a proteinelor continuă (existând un repaus aparent care precede mitoza);

–*mitoză (M)* - extrem de scurtă (cca. o oră) în care biosinteza RNA şi a proteinelor este mult diminuată, iar DNA se repartizează în mod egal între celulele fiice (în final fiecare celulă fiică conţinând DNA echivalent pentru 2n cromosomi).

In ansamblu, sub raport citocinetic, se disting patru faze succesive a căror durată variază în funcţie de tipul de celule şi de condiţiile de creştere (in vivo, in vitro).

O reprezentare schematică a relaţiei dintre cuantumul de DNA (implicit a numărului de cromosomi) şi perioadele care definesc citocinetica se prezintă în fig. 1-24. In secvenţa surprinsă diagramatic se remarcă particularităţile cronobiochimice şi cronofiziologice ale unui ciclu celular.

Fig.1-24. Citocinetica şi biosinteza DNA în relaţie cu numărul de cromosomi
G_1 - presinteza; S - sinteza; G_2 - postsinteza; M - mitoza

S-a descris, de asemenea, *o perioadă de repaus (G_0)* a ciclului celular în care celulele - de fapt în afara ciclului - nu sunt capabile de proliferare. Deci, se poate estima că sub raport citocinetic, în ciclul celular există un comportament proliferativ (cu perioadele G_1, S, G_2 şi M, descrise mai sus) şi un comportament neproliferativ (cu perioada G_0).

Problema citocineticii se asociază uneori studiilor de farmacocinetică interesând chimioterapia citostatică. Astfel, spre exemplu, celulele aflate în faza de repaus G_0 a ciclului celular sunt, de cele mai multe ori, refractare la acţiunea substanţelor anticanceroase (Sarma et al., 1975; Salmon şi Apple, 1976). Un aspect particular se remarcă în cazul corelării biosintezei DNA cu cronobiochimia şi perspectivele chimioterapeutice (Gârban et al., 1988; 1990).

Problema ciclului celular a fost studiată mai aprofundat in vitro - pe culturi de celule. Pe culturile celulare s-a aplicat şi sincronizarea ciclului celular, procedeu care rezidă în aducerea tuturor celulelor dintr-o cultură în aceeaşi fază a ciclului. După aceasta, declanşarea creşterii celulare se produce simultan printr-o manieră caracterizată de faptul că toate celulele parcurg în acelaşi timp perioadele ciclului celular.

1.7.4. TANATOCITOZA – UN CONCEPT ACREDITABIL

Investigaţiile întreprinse asupra constituenţilor materiei vii, în anumite condiţii, se pot extinde şi asupra constituenţilor decelabili prin investigaţiile post exitus.

Perfecţionarea şi extinderea metodelor analitice a permis apariţia unui nou domeniu – tanatochimia care are ca obiectiv investigarea produselor prelevate post exitus. Tanatochimia ca domeniu de investigaţie este utilizată în unele laboratoare de profil (e.g.: medicină legală, chimie judiciară, criminalistică).

In acest sens se menţionează extinderea aplicaţiilor unor metode analitice utilizate în *biochimie* – vizând lichide biologice, biopunctate etc. şi în *tanatochimie* - vizând lichide şi/sau ţesuturi prelevate prin necropsie.

Dacă despre metodele biochimice aplicate în chimia clinică există o vastă literatură şi funcţionează numeroase laboratoare de specialitate, nu acelaşi lucru se poate afirma despre tanatochimie (gr. Tanathos – zeul morţii).

Problema tanatochimiei are o extensie mult mai largă, interesând aspectele globale privind întregul organism, dar şi aspectele particulare interesând organele, ţesuturile şi chiar celulele. Pentru abordarea problematicii tanatochimiei în raport cu citologia convenim a utiliza termenul de *tanatocitoză*.

Conceptul de tanatocitoză defineşte moartea celulară marcată de o dinamică regresivă a proceselor morfofiziologice şi topobiochimice. Acreditarea acestui concept

obligă la o evaluare a particularităților morfologice și morfopatologice, fiziologice și fiziopatologice, biochimice și tanatochimice ale proceselor care conduc la moartea celulară.

Fără a intra în detalii, care depășesc cadrul acestui volum, se menționează că tanatocitoza poate fi caracterizată prin două moduri de "involuție" a materiei vii și instalare a morții celulare: *apoptoza și necroza.*

Apoptoza și necroza prezintă dihotomii și dualități. Ca dualități se poate remarca relația structură chimică-activitate biologică; relația caracteristici morfologice – atribute funcționale.

Pornind de la câteva date comparative morfofiziologice și topobiochimice privind apoptoza și necroza (tabel 1-6) se pot observa diferențe între: gradul de extindere al procesului; evoluția celulelor; statusul ultrastructurii nucleului și organitelor celulare; modificări ale structurii DNA nuclear prin fragmentarea macromoleculei de DNA la nivel internucleosomal etc.

Tabel 1-6. Particularități morfofiziologice și topobiochimice ale apoptozei și necrozei (date comparative)

Apoptoza	Specificare	Necroza
Circumscrisă ⬅ la o celulă	Gradul de extensie	➡ Extinsă la mai multe celule
Fragmentare în rezidii apoptice ⬅ (aspect non – cicatriceal)	Evoluția celulei	Hipertrofiere ➡ urmată de dezmembrare (aspect cicatriceal)
Dezmembrarea ⬅ cromatinei nucleare	Statusul ultrastructurii nucleului	➡ Disoluția întregului nucleu
Hiperplazie ⬅ în stadiul tardiv	Statusul ultrastructurii organitelor celulare	➡ Hiperplazie în stadiul inițial
Fragmentare constantă a DNA la nivel ⬅ internucleosomal (clivaj endonucleazic)	DNA nuclear (aspecte globale)	Fragmentare aleatorie ➡ a DNA la nivel internucleosomal (clivaj endonucleazic)
Limitată ⬅ și, în final, absentă	Sinteză de enzime oxidative	➡ Activată și până la final, prezentă

BCU "CENTRALA UNIVERSITARĂ" LIBRARY

Literatura de specialitate relevă faptul că apoptoza este un proces fiziologic, iar necroza un proces fiziopatologic. Mecanismele moleculare specifice apoptozei sunt studiate de biochimie, iar mecanismele moleculare specifice necrozei sunt studiate de patologia biochimică (patobiochimiă). Aceste mecanisme nu sunt pe deplin elucidate.

Apoptoza - a fost definită ca "moarte celulară programată" (Kerr et al., 1972). La originea acesteia se presupune că există un program genetic, deci şi un "set de gene" angajate în acest proces. Astfel privită, apoptoza se prezintă ca un proces fiziologic la baza căreia stau caracteristicile dinamice ale proceselor biologice: metabolismul, cronobiochimia, homeostazia biochimică.

De fapt problema morţii celulare prin apoptoză se adresează homeostaziei celulare care face trimitere la morfogeneză. S-a arătat că astfel de procese au loc în cursul embriogenezei la mamifere, a metamorfozei larvare la insecte etc. In domeniul embriologiei există numeroase dovezi ale existenţei unei morţi celulare (apoptotice), deci în condiţii fiziologice, e.g.: formarea spaţiului interdigital la mână (zona oaselor carpiene); formarea organelor sexuale feminine şi masculine etc. (Menkes, 1955). Apoptoza este prezentă şi în cursul vieţii, e.g.: involuţia unor ţesuturi prin reducerea statusului hormonal (prostata, endometrul, glanda mamară ş.a.); modificările apărute în sistemul imunitar (moartea unor clone limfocitare şi apariţia altora), condiţionate de apariţia unor noi antigene etc.

Necroza - caracterizează moartea celulară la originea căreia se află procese fiziopatologice şi morfopatologice. Procesul poate afecta diverse grupe de celule dintr-un ţesut sau organ cu compromiterea ireversibilă a funcţiilor vitale.

Procesul de *necroză* (gr. nekros-moarte) se poate instala brusc, ca o consecinţă a expunerii brutale la agenţi chimici, fizici sau biologici cu efecte distructive. Procesul poate însă să evolueze şi lent, fiind precedat de alterări progresive şi potenţial reversibile, situaţie în care se vorbeşte despre un proces de *necrobioză* (gr. nekros-moarte; bios-viaţă). Deci, se poate conchide că în necroză se instalează moartea celulară, iar în necrobioză există o cale potenţial reversibilă în evoluţia celulei lezate spre necroză. Uneori termenul de necrobioză este utilizat şi pentru anumite procese fiziologice, e.g.: reînnoirea elementelor figurate (hematii, leucocite, trombocite) din sânge; înlocuirea celulelor stratului epidermic al pielii cu celule noi.

In necroză se remarcă, la nivelul nucleului celular, condensarea cromatinei la periferia anvelopei nucleare – hipercromatoză marginală a nucleului, treptat volumul nuclear diminuă şi dobândeşte un contur neregulat (cariopicnoza), apoi se produce dezmembrarea nucleului (carioliza) cu menţinerea anvelopei nucleare. Aceasta din urmă poate fi considerată etapa disoluţiei nucleului.

La nivelul citoplasmei se observă un proces de omogenizare sau granulare fină. Reticulul endoplasmatic se fragmentează şi vacuolizează. Membranele mitocondriale se fragmentează, ribozomii şi aparatul Golgi dispar. Apare un proces de dezintegrare structurală a celulelor, care afectează ţesutul necrotic. Acest proces este denumit *autoliză* şi are loc în ţesutul necrotic la 12-24 ore după instalarea necrozei (Taşcă, 1976).

Apariţia necrozelor modifică statusul enzimatic al ţesutului. Acest fapt este mai uşor decelabil în necroza celulelor miocardice şi necroza celulelor hepatice.

Etiologia necrozei este multiplă: agenţi chimici, e.g.: substanţe toxice, injurii imunologice; agenţi fizici, e.g.: hipoxia, ischemia; agenţi biologici, e.g.: bacterii, virusuri, paraziţi .

Din punct de vedere morfopatologic se disting diverse tipuri de necroză: necroza de coagulare; de lichefacţie; necroza grasă (steatonecroza), necroza de decubit (escara), necroza de tip gangrenos – datorate unei suprainfecţii a ţesutului. In procesele de necroză apare aşa numita "sechestraţie", care rezidă în reţinerea (într-o etapă iniţială) în celulă a produşilor autolizei, urmată de eliberarea acestora în mediu, i.e. în ţesutul necrozat (Georgescu, 1982).

O remarcă specială se face cu referire la apoptoză şi necroză, în sensul că aceste procese – care în opinia noastră pot fi considerate ca şi cazuri particulare ale tanatocitozei – pot evolua concomitent. Astfel de observaţii s-au făcut în cazul neoplasmelor tratate prin mijloace specifice chimioterapiei citostatice şi al neoplasmelor în care s-au efectuat intervenţii chirurgicale urmate de depresia statusului hormonilor steroizi (androgeni sau estrogeni). In aceste situaţii s-au decelat, alături de procesele necrotice, şi unele procese apoptotice la nivelul ţesutului lezat.

BCU IASI/CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

BCU IASI/CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

2. INVESTIGAREA ULTRASTRUCTURII SI BIOCONSTITUENTILOR

2.1. METODOLOGIA GENERALA A INVESTIGATIILOR

In biologia moleculară investigaţiile experimentale asupra ultrastructurii, bioconstituenţilor şi topobiochimiei au în vedere trei aspecte esenţiale: 1) materialele biologice; 2) procedeele microscopice; 3) metodele biochimice.

Materialele biologice utilizate în experimentele de laborator se caracterizează printr-o mare diversitate. Pe astfel de materiale se întreprind cercetări ştiintifice fundamentale şi aplicative interesând variate domenii, e.g.: biologia, biochimia, fiziologia, farmacologia, fiziopatologia ş.a. In biologia celulară şi moleculară se pot efectua experimente: pe animale de laborator; pe organe (în stare izolată, ca sectiuni, ca omogenate sau extracte); pe celule (bacterii, levuri, celule izolate de la organisme superioare, culturi celulare); pe constituenţi subcelulari, pe virusuri şi pe enzime purificate.

Procedeele microscopice se adresează îndeosebi biologiei celulare, dar şi studiilor privind distribuţia tisulară a unor biomolecule (metode histochimice). In acest scop se folosesc diverse procedee, la baza cărora se află microscopia fotonică (optică) - considerată clasică şi microscopia electronică (electronomicroscopia) cu utilizare în extindere.

Metodele biochimice uzitate în biologia moleculară au în vedere determinările care abordează natura bioconstituentilor, interacţiile acestora şi studiul metabolismului. In acest scop se pot folosi metode diverse: măsurarea consumului de oxigen în excizate din ţesuturi (considerată metoda clasică); studiul mutanţilor auxotrofi; marcarea izotopică; cromatografia; spectrofotometria ş.a.

BCU IASI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

2.1.1. MATERIALE BIOLOGICE

Studiile experimentale asupra topochimiei bioconstituenţilor şi a caracterelor dinamice ale proceselor biologice (metabolism, cronobiochimie, homeostazie, homeorezie) - cu implicaţii în biologia moleculară, se efectuează pe diverse materiale biologice, descrise în continuare.

2.1.1.1. Organismul animal intact

Organismul animal intact a reprezentat unul din primele "materiale biologice" utilizate în cercetările experimentale vizând vitaminele, acizii aminaţi, acizii graşi etc. Astfel de compuşi sunt necesari echilibrului nutritiv la organismul adult sau creşterii la organismul tânăr. S-au studiat, de asemenea, compuşii indispensabili sau esenţiali care se asigură predilect prin aport exogen (alimentar). Sinteza acestora se poate realiza, în cantităţi reduse, şi în organism.

Pe organismul intact se pot studia diversele căi biochimice (biochemical pathways), urmărindu-se bilanţul general pentru intrări (input) şi ieşiri (output). Studiul transformărilor metabolice în organism (cu activitate fiziologică normală) se poate efectua la nivel global sau la nivel de secvenţe intermediare. Se face menţiunea că şi în biologia vegetală se pot întreprinde studii pe organisme luate ca "un întreg".

Experimentele întreprinse pe organismul animal intact interesează biochimia şi biologia moleculară prin diversitatea modelelor experimentale care pot oferi căi şi mijloace pentru investigarea metabolismului, cronobiochimiei, homeostaziei, homeoreziei (i.e. caracterele dinamice ale proceselor biologice). In general, astfel de experimente se pot face pe: insecte (e.g.: Drosophila melanogaster - musculiţa de oţet); pe animale de laborator, îndeosebi pe mamifere (e.g.: Rattus norvegicus - şobolanul; Mus musculus - şoarecele; Cavia porcellus - cobaiul; Cricetus cricetus - hamsterul ş.a.); pe animale domestice (ovine, bovine, suine, leporide, păsări ş.a.). In experimentele întreprinse în domeniul biologiei moleculare se pot urmări diverse aspecte legate de transferul de gene, efectele somatotropinei, animalele transgenice, recombinarea genică mediată biotehnologic ş.a..

Experimentele pe animale au precedat aplicaţiile biologiei moleculare la om, e.g.: obţinerea insulinei pe căi specifice biotehnologiei DNA recombinant (insulina obţinută pentru uz uman se numeşte "humulină"); investigarea amprentei DNA; cartarea genomului uman etc.

Pentru experimentele pe animale de laborator - numite adesea în literatura de specialitate şi "animale de experienţă" - s-au obţinut diverse linii a căror selecţie s-a făcut zeci de ani. Astfel de animale trebuie să corespundă anumitor standarde morfologice, fiziologice şi chiar imunologice (pentru studii întreprinse în acest domeniu). Cu referire la

animalele de laborator există o vastă literatură de specialitate care oferă informații privind diverși parametri în relație cu: a) **morfologia**, e.g.: somatometria staturală (talie, diametre) și somatometria ponderală (greutatea la naștere, la vârste adulte etc.); b) **fiziologia**, e.g.: ritm cardiac, ritm respirator, homeostazia termică (matinală, vesperală); c) **biochimia**, e.g.: date privind homeostazia biochimică a unor metaboliți - proteinemia (cu fracțiuni proteice), lipemia și lipoproteinemia (cu fracțiuni lipoproteice), glicemia, electrolitemia (natremia, magnezemia, calcemia etc.); d) **biologia celulară și moleculară**, e.g.: numărul de cromosomi, particularitățile genomului, DNA cromosomal, relația cromosomi-gene (localizarea genelor pe cromosomi) în corelație cu erdedobiologia și eredopatologia etc.

2.1.1.2. Organele

Organele, ca formațiuni anatomice aparținătoare diferitelor aparate și sisteme, pot constitui materiale biologice care se pretează foarte bine cercetărilor de laborator.

Organele izolate - sunt studiate prin irigare pe calea vasculară naturală, în acest scop menținându-se (în parte) rețeaua vaselor aferente și eferente ale căror conexiuni sunt conservate. Pentru perfuzie se pot utiliza: sânge, plasmă sau soluții fiziologice (izotonice) diverse. Experimental se urmăresc modificările compoziției lichidului de perfuzie și/sau acțiunea acestuia asupra organului studiat (e.g.: ficatul).

Secțiunile de organe - se așează într-un mediu lichid apropiat de acela natural, în care se află celulele din organism. Organele pot fi secționate foarte fin pentru a putea urmări detaliile celulare. Se administrează, în mediul acestor secțiuni un compus chimic colorat și se urmărește acțiunea acestuia asupra unor constituenți ai secțiunii respective. Secțiunile de organe conțin încă celule organizate, cu membrane, care joacă un rol selectiv pentru pătrunderea compușilor chimici în celulă.

Omogenatele de organe - permit studierea acțiunii compușilor chimici care nu pot penetra direct în celulă, astfel, eliminându-se rolul permeabilității membranelor. Pentru aceasta fragmentele de organe prelevate (e.g.: ficat de la animale de experiența), se excizează în bucăți mici și se supun broiajului. Pentru *broiaj* se folosește, în general, un omogenizator de tip Potter (fig 2-1).

Omogenizatorul este format dintr-o eprubetă de sticlă (cu rugozități în partea interioară) și un piston de teflon care realizează o mișcare pe verticală în ambele sensuri și o mișcare de rotație în jurul axei proprii (acționat fiind de un motoraș electric). Omogenizarea excizatelor de organe se face în soluții izotonice, considerate ca medii de omogenizare, e.g.: zaharoza (sucroza).

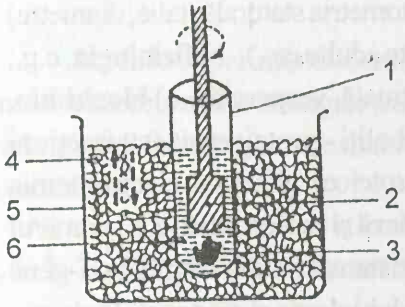


Fig. 2-1. Omogenizator de tip Potter
1.Eprubeta de sticlă; 2. Piston de teflon; 3. Excizat de ţesut pentru broiaj; 4. Soluţie izotonică; 5. Vas

Prin broiaj (la cca. 600 rotaţii pe minut) membranele celulare se rup, iar în omogenat vor apare particulele subcelulare cum ar fi nucleele, mitocondriile, lizosomii, ribosomii ş.a. Omogenatul este apoi trecut prin site de oţel inox separându-se resturile de ţesut conjunctiv, fragmente de vase sanguine etc. Particulele subcelulare, rămase intacte sunt separate în continuare prin centrifugare diferenţiala. Fracţiunile rezultate pot fi testate "in vitro" urmărindu-se acţiunea acestora în diverse căi metabolice (e.g.: fracţiunile ribosomale intervin în cataliza unor secvenţe ale biosintezei proteinelor).

Extractele de organe - provin din omogenatele supuse centrifugării, prin care se depun diversele particule rezultate. Supernatantul - reprezentând extractul de organe - conţine constituenţii solubili ai celulelor şi numeroase enzime.

2.1.1.3. Celulele

Celulele (lat. cella - cameră de dimensiuni reduse) reprezintă o altă categorie de materiale biologice care pot fi supuse investigaţiilor. In mod curent se fac studii pe celule izolate şi în particular pe microorganisme (e.g.: bacterii, levuri).

Bacteriile - sunt celule **procariotice**, lipsite de nucleu, care se pretează utilizării ca material biologic pentru întreprinderea unor importante lucrări experimentale. Astfel, bacteriile, în particular Escherichia coli, au oferit biochimiei şi biologiei moleculare un vast câmp de investigaţii pentru numeroase probleme biologice fundamentale privitoare la intervenţia macromoleculelor.

Bacteriile au avantajul că prezintă în aceeaşi celulă toate funcţiile indispensabile vieţii, având atributul de organisme procariotice. In aceste microorganisme sintezele biochimice se derulează cu viteză mai mare comparativ cu acelea din celulele animalelor superioare. Reproducerea rapidă a bacteriilor face ca acestea să reprezinte un excelent material pentru cercetările de biologie moleculară.

Levurile - sunt organisme **eucariote** în care celulele au un nucleu distinct, circumscris de anvelopa (membrana) perinucleară. Aceste celule au fost de mult timp studiate datorită participării lor la procesele fermentative. Enzimele prezente în levuri au permis efectuarea unor importante lucrări asupra biotransformărilor metabolice.

Experimental s-au studiat transformările anaerobiotice ale glucozei în levuri, stabilindu-se că acestea sunt asemănătoare transformărilor din mușchii mamiferelor. Constatarea a condus, pentru prima dată, la acceptarea conceptelor privitoare la existența "unei relative uniformități a fenomenelor biochimice în ansamblul organismelor vii". O astfel de generalizare nu poate fi făcută fără precauții, apărând clar faptul că materialul de studiu nu are necondiționat un rol fundamental. Observațiile făcute pe un anumit tip de celule pot fi, în mare parte, transpozate la numeroase celule vii. Din aceste considerente și levurile se pretează utilizării pentru cercetările de biologie moleculară.

Celule izolate - în această formă se studiază celulele prelevate de la animale. Astfel, diferitele celule din sângele circulant și din măduva osoasă pot fi izolate și incubate în vederea cercetării.

Celule în culturi - se realizează pe medii speciale (pentru celule din regnul animal și vegetal). Culturile de celule prezintă avantaje metodologice în raport cu microorganismele. Pe celulele din culturi se pot studia caracterele specifice ale eucariotelor, cum ar fi: diferențierea celulară, legarea hormonilor, reglarea creșterii etc. De asemenea, se pot studia particularitățile celulelor canceroase.

In culturile de celule s-a constatat că celulele normale, putin diferențiate, cum ar fi fibroblastele, se multiplică într-un timp relativ lung, după care intervine moartea celulară. O situatie aparte prezintă celulele canceroase care au o perioadă de multiplicare indefinită.

2.1.1.4. Constituenti subcelulari

Constituenți subcelulari rezultă, așa cum s-a arătat, din omogenatele de organe. Prin centrifugare diferențială s-au izolat diferite tipuri de particule subcelulare, i.e. formațiuni intracelulare - la procariote; organite celulare - la eucariote. Astfel a devenit posibilă în studierea funcțiilor specifice variațiilor diverșilor constituenți subcelulari, a rolului acestora în biogeneza diverșilor compuși ai catabolismului și/sau anabolismului desemnați prin termenul generic de *"metaboliți"*.

2.1.1.5. Virusurile

Virusurile sunt formațiuni nucleoproteidice acelulare capabile de-a se reproduce în celulele animale, vegetale și bacteriene. Virusurile care se dezvoltă în bacterii sunt denumite bacteriofagi sau fagi (gr. phagein - a devora). Cercetările de genetică întreprinse pe virusuri au jucat un rol fundamental în evoluția cunoștințelor de biologie moleculară.

2.1.1.6. Enzimele izolate

Enzimele izolate se pot obține în stare de puritate avansată și chiar în stare

cristalizată. Fiind catalizatori ai reacţiilor biochimice în care apar legături covalente, enzimele sunt utilizate în studiul proceselor metabolice (investigaţii calitative şi/sau cantitative). Astfel de studii sunt importante pentru înţelegerea interacţiilor biochimice.

In investigaţiile biochimice efectuate cu enzime izolate se impune evaluarea corectă a rezultatelor şi extrapolarea prudentă a datelor în cadrul transpozării la celulele vii. Aceasta din mai multe motive, din care două pot fi considerate esenţiale: 1) In condiţii de izolare, enzimele - părăsind mediul lor natural - au un "comportament" diferit în raport cu acela avut în celulă. Aceasta datorită faptului că celula reprezintă un mediu complex cu caracteristici fizico-chimice bine definite; 2) In celulă enzimele sunt numeroase, formând complexe multienzimatice în care un compus poate fi transformat de o enzimă, iar produsul rezultat este transformat de o altă enzimă. Astfel de complexe, înalt structurate, asigură o succesiune de transformări care nu pot fi realizate de enzimele izolate.

Remarcabil este faptul că "enzimele izolate"se obţin prin procedee industriale. Din punct de vedere biologic, referitor la producerea de enzime, se precizează că există:

- *enzime exocelulare* – care sunt excretate în mediul de cultură (culturi de celule) sau în lichide biologice. Aceste enzime se află diluate în mediu de producere. Prepararea acestora porneşte de la lichide biologice, necesitând etape de concentrare. Enzimele sunt în stare naturală, instabile şi nu pot fi stocate. Din aceste motive se impune purificarea acestora.
- *enzime endocelulare* – care sunt produse de celule provenite din ţesuturi vegetale şi animale. Pentru extragerea acestor enzime se procedează la distrugerea mecanică a peretelui celular şi a structurilor subcelulare. Enzimele - în acest stadiu – se află într-un mediu foarte complex, stabilizarea acestora fiind posibilă doar în condiţii de congelare. Pentru producerea enzimelor în continuare, se uzitează metode de "imobilizare enzimatică". Enziml obţinute sunt însoţite de o "fişă descriptivă" care furnizează date privind: procedeul de obţinere (industrială); specificul activităţii enzimatice; metode de dozare; sursa de origine (e.g. microorganismre); inhibitori; activitatea în funcţie de pH; stabilitatea termică; domeniul de utilizare, etc.

Sub raport metodologic, experimentele întreprinse pe diverse materiale biologice diferă. Astfel se disting experimente *"in vivo"* - efectuate pe organisme vii uni- sau multicelulare şi experimente *"in vitro"* - efectuate pe preparate celulare sau pe extracte biologice.

2.1.2. PROCEDEE DE MICROSCOPIE

Microscopia reprezintă o tehnică de investigare curent uzitată în biologia celulară şi moleculară pentru decelarea ultrastructurilor specifice sistemelor biologice. In acest

scop s-au conceput şi se aplică diverse procedee de microscopie. Mai obişnuite - în studiile microscopice asupra materialelor biologice - sunt procedeele bazate pe traversarea luminii sau electronilor prin diverse preparate biologice, prelucrate sub forma unor secţiuni fine.

2.1.2.1. Principii generale

Imaginea microscopică (gr. micros - mic; scopia - vedere) oferă informatii specifice asupra preparatului biologic, pe care ochiul uman nu le poate discerne. La traversarea preparatelor, lumina sau electronii prezintă modificări care permit vizualizarea ultrastructurii. Apoi, prin diverse sisteme de lentile, se realizează amplificarea imaginii. Imaginile, au relevantă grație contrastului lumină/întuneric şi diferenţelor de culoare.

Evident problema microscopiei comportă o discuţie mai detaliată privind aspectele fizice (optice, electromagnetice ş.a.) pe care însă nu o permite spaţiul rezervat acestui subiect. Se amintesc totuşi câteva noţiuni mai importante ca: lungimea de undă (λ); intensitatea luminii incidente (I_o) şi emergente (I); amplitudinea (a). Cu aceste noţiuni se operează în domeniul microscopiei.

Pentru vizualizarea detaliilor dintr-un preparat biologic (prelucrat pentru microscop), lumina trebuie să-şi modifice intensitatea şi/sau culoarea. Aceste modificări sunt consecutive unor efecte fizice (e.g.: absorbtia) sau chimice (e.g.: interacţii cu diverşi bioconstituenţi din preparatul microscopic). Astfel, spre exemplu, o zona mai închisă în jurul nucleului poate releva conţinutul acestei formaţiuni celulare. Similar, o culoare distinctivă sau o modificare a intensităţii luminoase poate contribui la delimitarea şi definirea organitelor celulare. In această manieră se pot obtine diverse informaţii ultrastructurale, la baza cărora stau de fapt procese biochimice şi biofizice, cu implicaţii fiziologice sau fiziopatologice.

In microscopie se evaluează limitele de **rezoluţie** ale instrumentelor. Rezoluţia (d) reprezintă capacitatea unui sistem optic de a distinge - ca entităţi separate - două "puncte" foarte apropiate dintr-un preparat biologic. Calculul rezoluţiei se face după relaţia:

$$d = \frac{0{,}612\,\lambda}{n \sin \alpha} \qquad \text{(exprimat în } \mu\text{m sau Å)}$$

în care: λ - lungimea de undă a fasciculului luminos folosit la iluminarea preparatului

n - indicele de refracţie al uleiului de imersie (n=1,512)

α - semiunghiul aperturii microscopului (> 0,94°)

Mărimea rezoluţiei este influenţată de fenomenul de difracţie a luminii şi de aberaţia de sfericitate a lentilelor.

BCU IASI/CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Microscoapele optice au o putere de rezoluţie de cca. 0,25 mm (2500Å). Pentru a mări puterea de rezoluţie a microscoapelor optice există o singură modalitate, aceea de-a folosi la iluminarea preparatelor o radiaţie electromagnetică cu lungime de undă mai mică. Deci, în locul radiaţiei din spectrul vizibil se poate folosi o radiaţie din spectrul ultraviolet (UV). Prin folosirea unei radiaţii în ultraviolet puterea de rezoluţie poate ajunge la 10mm (1000Å). In investigarea preparatelor biologice, microscopul optic nu poate depăşi această limită.

Problema îmbunătăţirii vizualizării preparatelor biologice - prin depăşirea limitelor vizibilului - s-a realizat odată cu aparitia microscoapelor electronice.

Fundamentarea opticii electronice care are ca obiect de studiu mişcarea electronilor în vid sub influenţa câmpurilor electrice şi magnetice a fost precedată de o seamă de descoperiri în fizică. Între acestea se menţionează: descoperirea existenţei electronilor (Thomson, 1897); construirea tubului osciloscopic cu spot de electroni şi studierea mobilităţii spotului electronic sub acţiunea unui câmp magnetic (Braun, 1895-99); definirea caracterului ondulatoriu al electronilor, deci, a dualităţii undă-particulă (de Broglie, 1924); descoperirea rolului de "lentilă electromagnetică" a câmpurilor electrice şi magnetice în raport cu electronii (Busch, 1926).

Intre acestea se relevă - prin importanţa aplicativă - construirea tubului osciloscopic care prezintă catod, anod, diafragmă limitatoare a radiaţiilor electronice. In exteriorul tubului osciloscopic există un câmp magnetic care putea deflecta fasciculul de raze catodice (i.e. electroni). Acest fascicul, după traversarea diafragmei, era receptat datorită fluorescenţei produse pe un ecran metalic tratat cu platinocianură de bariu. Acest tub osciloscopic a precedat microscoapele electronice şi nu numai (a stat la originea tuburilor catodice utilizate în televiziune, radiolocaţie, sisteme de afişare electronică etc.).

De asemenea, o importanţă aparte a avut definirea caracterului ondulatoriu al electronilor. Dualitatea undă-particulă stabilită de Louis de Broglie a condus la ideea similitudinii dintre electroni şi fotoni. S-a definit astfel o lungime de undă (λ) a electronilor:

$$\lambda = \frac{h}{mv}$$

în care: h - constanta Planck ($6{,}63 \cdot 10^{-34}$ J.s)

v - viteza electronului

m - masa electronului

Această constatare a demonstrat că radiaţiile electronice (emise de catod) şi radiaţiile fotonice sau optice (emise în cazul luminii naturale sau produse de surse de lumină artificială) permit anumite paralelisme.

Ulterior, descoperirea primei lentile "electro-magnetice" cu capacitate de focalizare a radiaţiilor electronice (catodice) sau de dispersare a acestora a deschis drumul spre construcţia microscopului electronic şi spre dezvoltarea altor domenii ale electrotehnicii.

Informaţiile obţinute cu ajutorul microscopiei au contribuit în mare parte la progresele realizate în domeniul biologiei celulare şi moleculare. In acest scop s-au folosit diverse procedee de microscopie şi tipuri de microscoape.

2.1.2.2. Caracteristicile procedeelor de microscopie

O succintă prezentare a diverselor procedee de microscopie oferă un cadru general pentru înțelegerea posibilităților şi limitelor acestora. In acest context se discută microscopia fotonică (optică) şi microscopia electronică.

Microscopia fotonică a fost inițiată odată cu descoperirea primului instrument destinat acestui scop, în 1590, de către frații Zacharias şi Hans Jansen. Denumirea de "microscop" a fost dată ulterior, în 1614 de către Demisciano. Aparatura a fost pefecționată apoi de Robert Hooke (1635-1703) care a introdus şi noțiunea de "celulă". Ulterior microscopia fotonică a fost dezvoltată de-a lungul secolelor XVIII-XX.

Aparatul utilizat este microscopul fotonic - un instrument optic constituit din două sisteme de lentile (denumite uzual "obiectiv" şi "ocular") şi un sistem de iluminare. Pentru iluminare se utilizează lumina naturală sau lumina `produsă de o sursă (artificială)care trebuie să se extindă pe domeniul lungimilor de undă specifice luminii vizibile (λ=3500-7000 A) şi/sau ultraviolete (λ < 3500 A).

Microscopia electronică a apărut după anul 1931 când Ernst Ruska a construit primul microscop cu "lentile electromagnetice". Apoi, în 1932 Brachet şi Johannson au realizat microscopul electronic cu "lentile electrostatice". Ulterior tipurile de microscoape electronice s-au diversificat iar procedeele specifice electronomicroscopiei au cunoscut o dezvoltare continuă.

In microscopia electronică se folosesc radiații electromagnetice cu lungimea de undă mult mai mică (λ » 0,055Å) generate de un catod, din wolfram, adus la incandescență. Lungimea de undă a radiațiilor electromagnetice utilizate în microscopia electronică este de 100.000 ori mai mică decât în microscopia optică. Cu ajutorul microscopului electronic a devenit posibilă vizualizarea unor formațiuni biologice cu dimensiuni mai mici decât 100 µm. In acest mod a devenit posibilă aprofundarea cunoştințelor privitoare la virusuri şi la ultrastructura celulelor procariotice şi eucariotice.

2.1.2.3. Microscopia fotonică

In cadrul microscopiei fotonice (optice) se utilizează radiațiile în domeniul vizibil şi ultraviolet. Examinarea preparatelor microscopice se poate efectua în câmp luminos, câmp întunecat, în contrast de fază etc.

2.1.2.3.1. Microscopul fotonic

Microscopul fotonic, sub raport constructiv, prezintă partea optică şi partea mecanică.

Partea optică este constituită, din trei subansamble: sistemul de iluminare, condensor şi sistemele de lentile.

Sistemul de iluminare - asigură şi direcţionează lumina naturală sau preia şi direcţionează lumina provenită de la o sursă. In mod curent este utilizată lumina provenită de la o sursă. In acest scop microscopul are şi un transformator de tensiune conectat între dispozitivul de iluminat şi reţeaua de alimentare cu curent electric.

Condensorul - montat sub masa port-obiect a microscopului (denumită şi "platina microscopului"), este utilizat pentru a aduce imaginea "piesei de examinat" în câmpul microscopului şi a-i asigura lumina necesară.

Sistemele de lentile - incluse în tubul microscopului - sunt reprezentate de: lentilele obiectiv - dispuse spre partea distală (inferioară a tubului) şi vizează "piesa de examinat" (preparatul); lentilele ocular - dispuse spre partea proximală a tubului, îndreptată spre ochiul observatorului. În fig. 2-2 se face prezentarea schematică a microscopului fotonic.

Partea mecanică este reprezentată de câteva piese esenţiale pentru oricare tip

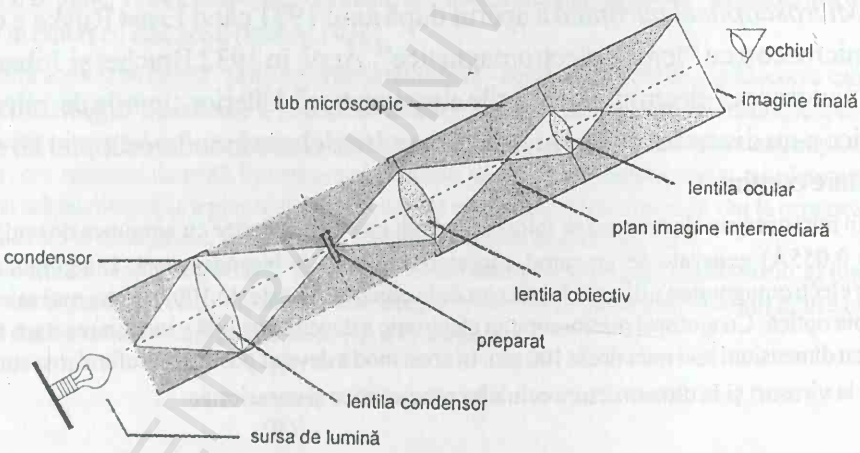


Fig. 2-2. Microscopul fotonic (explicaţii în text)

de microscop fotonic. Dintre componentele mecanice se menţionează: *piciorul* - reprezentând suportul (talpa) pe care se sprijină microscopul; *coloana* - pe care se suspendă diverse piese (subansamble) microscopice; *revolverul* - care constituie un suport mobil (rotativ) în care se înşurubează diversele piese "port-ocular"; *platina* sau *masa port-obiect* pe care se plasează diversele "piese de examinat" dispuse iniţial pe o lamă microscopică (din sticlă); *călăreţii* - constituind două dispozitive cu ajutorul cărora se fixează lama microscopică pe platină; *tubul microscopului* - piesă metalică cilindrică în care se fixează "lentilele ocular" în partea proximală (superioară) şi "lentilele obiectiv" în partea

B.C.U. "M. EMINESCU" IAŞI

distală (inferioară). Evident alături de aceste piese mai trebuie menționate *diafragma* de apertură - care servește la "fixarea" fasciculului luminos pentru vizualizarea piesei de examinat și *șuruburile* pentru *viza macro-* și *micrometrică* - utilizate pentru clarificarea imaginii microscopice.

În microscopia fotonică pot să existe distorsii informaționale date de aberațiile lentilelor. Cu privire la aberații se citează: 1) aberația de sfericitate; 2) aberația cromatică; 3) distorsionarea imaginii; 4) astigmatismul. Prin construcție microscoapele trebuie să prezinte valori minime a acestor aberații.

O explicație mai detaliată asupra construcției microscopului, a modului de operare cu acesta și a condițiilor de utilizare și întreținere se poate afla în lucrări de specialitate interesând histologia, citologia, microbiologia, virusologia și, în general, tehnicile de laborator utilizate în aceste domenii.

2.1.2.3.2. Tehnici specifice

In microscopia fotonică s-au elaborat o seamă de tehnici specifice cu aparatură adecvată scopurilor propuse. O succintă descriere a diverselor tehnici specifice microscopiei optice, se prezintă în cele ce urmează.

- *Microscopia în câmp luminos.* Această tehnică de examinare a preparatelor se bazează pe folosirea unui microscop fotonic (optic) cu un sistem de lentile condensatoare. Asupra preparatului (pus pe suportul microscopului) se face focusarea luminii, urmărindu-se formarea imaginii în planul focal al obiectivului. Imaginea obținută redă capacitatea de rezoluție a instrumentului. In general se estimează că aceste microscoape pot reda puncte situate la distanță de cca. 0,2 μm.Prin acest procedeu se pot studia diverse preparate histologice colorate sau necolorate. In astfel de preparate se realizează o absorbție diferențiată a luminii, ceea ce permite vizualizarea diferitelor structuri. Progresele realizate în acest domeniu au permis elaborarea unor tehnici numite "histochimice", care au făcut posibilă colorarea selectivă a numeroși compuși chimici din preparatele microscopice.
- *Microscopia în câmp întunecat.* Tehnica aceasta permite vizualizarea preparatelor necolorate. In acest caz radiația luminoasă nu este proiectată pe obiectiv prin condensator, ca la microscopul convențional (în câmp luminos). Iluminarea probei se face lateral. Astfel, în câmpul microscopului vor apărea imagini luminate pe un fond întunecat (metoda s-a utilizat la studiul microorganismelor în medii lichide). Procedeul acesta a fost înlocuit, în mare parte, cu microscopia în contrast de fază.

BCU "M. EMINESCU" IAŞI UNIVERSITY LIBRARY

♦ *Microscopia în contrast de fază.* Se bazează pe faptul că lumina fiind o radiație electromagnetică are caracter sinusoidal. În cazul unor fascicule de lumină cu diferență de fază, preparatul histologic (având componente cu densitate diferită) influențează transmiterea luminii.Diferențele de fază, imperceptibile cu ochiul liber, pot fi convertite - cu ajutorul microscopului de fază - în diferențe de amplitudine. Astfel, acest tip de microscopie permite observarea unor detalii ale ultrastructurii celulare, îndeosebi la preparatele microscopice colorate.

♦ *Microscopia cu interferență de fază.* Se aplică la studiul preparatelor histologice necolorate, oferind şi unele date despre proprietățile fizice (organizarea submicroscopică a țesutului). Există, de asemenea, o diferență de fază la fasciculul de lumină transmis, indusă de diferențele de densitate optică ale diverselor părți ale preparatului biologic.În microscopia cu interferență de fază, radiația luminoasă cu întârziere de fază este comparată cu o radiație de referință. Deoarece între densitatea optică, întârzierea de fază şi masa diferitelor componente structurale ale celulei există o proporționalitate, procedeul se pretează şi evaluărilor cantitative ale acestor componente. Deci, face posibilă şi morfometria în citologie.

♦ *Microscopia în fluorescență.* Se bazează pe faptul că la focusarea luminii ultraviolete (UV) asupra unei probe, aceasta poate determina inducerea unei emisii de lumină vizibilă. Substanțele fluorescente - utilizate ca reactivi pentru colorarea preparatelor histologice - au proprietatea de-a absorbi lumina de o altă frecventă. Lungimea de undă a luminii re-emise reprezintă o caracteristică a substanței fluorescente. Există chiar compuşi de interes biologic, cum ar fi vitamina A, care prezintă autofluorescență. In alte cazuri se folosesc reactivi speciali - substanțe fluorescente.Prin microscopia în fluorescență se pot efectua investigații pe preparate histologice necolorate, vizualizarea fiind asigurată de substanțele utilizate fluorescente.

♦ *Microscopia în ultraviolet.* Pentru cercetările de specialitate, microscopia în ultraviolet, ca şi microscopia prin fluorescență, presupune construirea unor instrumente care permit utilizarea luminii ultraviolete în locul luminii vizibile. In acest scop microscoapele au un "sistem optic" echipat cu *lentile de cuarț* care transmit radiațiile ultraviolete.

Imaginea văzută la ocularul microscopului în ultraviolet, este înregistrată pe un film fotografic, deoarece lumina ultravioletă (situată în afara spectrului vizibil) este dăunătoare pentru ochi. Radiația în UV are o lungime de undă mai mică decât radiația în vizibil, ceea ce face ca - pentru anumiți bioconstituenți - microscopul în ultraviolet să aibă o rezoluție mai mare comparativ cu microscopul în câmp luminos (vizibil).

Microscopul în ultraviolet a făcut posibilă evidenţierea unor constituenţi subcelulari. Astfel, acizii nucleici care absorb radiaţiile în UV la lungimi de undă specifice, au putut fi studiaţi cu acest microscop.

♦ *Microscopia de polarizare*. Această tehnică se pretează pentru investigarea materialelor biologice care au indici de refracţie diferiţi în raport cu axele optice. Asemenea materiale - birefringente sau anizotrope - pot converti fasciculul de lumină linear polarizată în lumină eliptic polarizată care este transmisă unui analizor şi vizualizată.

Polarizarea luminii caracteristică substanţelor anizotrope se face cu ajutorul unui polarizor (de obicei o prismă de cuarţ Nicol) capabil să transmită doar lumina plan-polarizată. Prin rotirea analizorului, polarizarea luminii transmise de probă poate fi determinată şi astfel devine posibilă evaluarea modificărilor caracteristice preparatului biologic. In această manieră abilitatea materialului biologic de a schimba lumina liniar polarizată indică, în structura infracelulară, existenţa unor molecule asimetric orientate.

Cu ajutorul microscopiei de polarizare s-au putut studia filamentele, fibrele, proteinele lineare (toate acestea prezentând birefringenţă). Complexele lipoprotidice prezente în membranele celulare au, de asemenea, proprietăţi de polarizare. In general această tehnică microscopică a fost utilizată în cercetarea fibrelor musculare, fibrelor din ţesutul conjunctiv. La nivel celular a fost posibilă studierea aparatului mitotic (nucleu, reticul endoplasmatic, ribosomi ş.a.) şi membranelor celulare.

2.1.2.4. Microscopia electronică

In microscopia electronică se foloseşte ca sursă luminoasă radiaţia electromagnetică cu lungimea de undă de 0,0859-0,0028 A. Aceasta este dependentă de tensiunea de accelerare, care poate fi cuprinsă între 20-4000 kV. fasciculul de electroni, constituit din particule negative, nu poate traversa sticla. Din aceste considerente în microscopul electronic lentilele sunt substituite prin spirale electromagnetice care (similar unor coliere) înconjoară fasciculul de electroni. Puterea acestor "lentile electromagnetice" poate fi modificată prin variaţia intensităţii curentului care străbate spirele.

2.1.2.4.1. Microscopul electronic

Construcţia şi funcţionarea microscopului electronic se bazează pe utilizarea unui *fascicul de electroni* produs de un tub catodic cu un filament de wolfram. Acest tub catodic este numit, în unele lucrări de specialitate, şi "tun electronic". fasciculul de electroni

- în funcţie de particularităţile constructive ale microscopului- este trecut prin câmpuri electrostatice sau prin câmpuri electromagnetice. Aplicându-se tensiuni de accelerare, electronii sunt focalizaţi şi dispersaţi spre a forma o imagine specifică. Astfel de imagini, obţinute pe un ecran fluorescent, se numesc *electronografii*.

Electronii prezenţi în câmpuri (electrostatice sau electromagnetice), deci din "sistemele electromagnetice" prezintă similitudini şi pot fi comparaţi cu fotonii din "sistemele de lentile" ale microscopului fotonic. Din aceste considerente câmpurile electrostatice şi câmpurile electromagnetice au fost denumite *"lentile electromagnetice"*.

Câmpurile electrostatice - sunt produse de discuri metalice sau de cilindrii metalici la a căror suprafaţă există un potenţial electric. Aceste lentile au dezavantajul că realizează distanţe focale scurte şi prezintă degradabilitate accentuată.

Câmpurile electromagnetice - sunt produse de o bobină (tip solenoid) care este constituită dintr-un miez de fier cilindric (perforat axial) în jurul căruia se înfăşoară spirele bobinate. Întreg solenoidul este închis într-o carcasă spre a proteja spirele de câmpuri electromagnetice externe. Câmpul magnetic se realizează la nivelul perforaţiei axiale a bobinei (fanta acesteia) şi are o simetrie rotaţională. Electronii intraţi în acest câmp realizează o mişcare helicoidală după care sunt focalizaţi.

Prezentarea generală a microscopului electronic este redată în fig. 2-3.

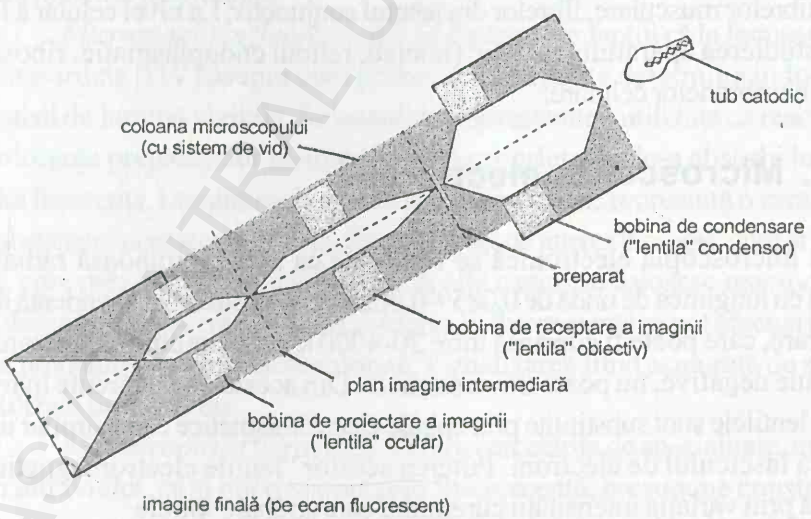


Fig. 2-3. Microscopul electronic (explicaţii în text)

Datele expuse relevă anumite similitudini existente între microscopul fotonic şi microscopul electronic.

In laboratoare se utilizează microscoape electronice de transmisie şi microscoape electronice de baleiaj.

Din punct de vedere constructiv microscopul electronic prezintă: partea electronooptică şi partea mecanică.

Partea electronooptică este formată din: tubul catodic care generează electronii reprezentată de un electrod de wolfram adus la incandescenţă; trei câmpuri electromagnetice (prezentând rol similar lentilelor de la microscopul fotonic) care au rol de condensor, obiectiv şi ocular; sistemul de înregistrare a imaginii format dintr-o peliculă fotografică sau un ecran fluorescent.

Partea mecanică este reprezentată de coloana microscopului care include tubul catodic şi câmpurile electromagnetice; sistemul de vid -necesar pentru a evita dispersia electronilor generaţi de catod; consola de comandă - pe care sunt dispuse comutatoare pentru control şi operare la microscop.

2.1.2.4.2. Tehnici specifice

În domeniul electronomicroscopiei se utilizează diverse tehnici specifice, care diferă în funcţie de tipurile de microscoape şi performanţele echipamentelor cu care sunt dotate. În această situaţie investigaţiile cu ajutorul microscopiei electronice pot viza ultrastructura materiei vii şi, în anumite limite, aspecte analitice biochimice (specifice biologiei moleculare).

În uzul curent al laboratoarelor de cercetare există în prezent două tehnici principale specifice microscopiei electronice:

- *Microscopia electronică de transmisie.* Se utilizează pentru examinarea preparatelor fine interesând ultrastructura virusurilor, celulelor procariotice şi eucariotice. Evidenţierea imaginilor este asigurată de un fascicul (primar) de electroni generat de filamentul de wolfram (tungsten) al tubului catodic. Puterea de mărire poate să ajungă la 800.000. Astfel devine posibilă vizualizarea până la nivelul unor biomacromolecule.
- *Microscopia electronică de baleiaj.* Această tehnică se pretează pentru examinarea preparatelor cu dimensiuni variabile, în general mai grosiere şi cu suprafeţe neregulate. Se pot evidenţia imagini tridimensionale ale preparatelor cercetate. Imaginea este obţinută cu ajutorul electronilor dintr-un fascicul secundar (reflectat) care apare în urma bombardării preparatului cu un fascicul primar de electroni. fasciculul primar de electroni este baleiat cu ajutorul a două bobine de deflexie. Astfel devine posibilă explorarea preparatelor groase, "netransparente" pentru electroni prin obţinerea unei imagini cu aspect de relief.

BCU IASI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Acest microscop are o limită de rezoluţie mai mică.

Electronii din fasciculul electronic pot interacţiona cu moleculele prezente în aer conducând la distorsii informaţionale. Din aceste considerente "sistemul optic" al microscopului electronic trebuie sa fie lipsit de aer (este necesar un vacuum de 10 mmHg).

Pentru obţinerea fasciculul electronic - prin încălzirea unui filament de tungsten (wolfram) - în prezent se folosesc tensiuni de 40.000 - 100.000 V. La tensiuni mai mari se produc fascicule de electroni cu lungime de undă mai mică, care sunt mai penetrante având o putere de rezoluţie crescută.

Deoarece fasciculele de electroni sunt invizibile pentru ochiul uman, imaginile probelor biologice studiate sunt proiectate pe un ecran fluorescent şi, în final, sunt înregistrate pe o placă fotografică.

Probele biologice trebuie să fie stabile în vacuum şi să fie foarte subţiri pentru a putea fi traversate de electroni. Secţiuniile electronomicroscopice au grosimea aproximativa de 0,025 mm (250 A), fiind obţinute cu ajutorul unor aparate speciale de secţionare (ultramicrotoame) şi a unor tehnici speciale de fixare şi incluziune. Acestea fiind foarte subtiri, au un contrast intrinsec redus şi trebuie colorate cu substante care conţin metale grele (deci cu capacitate mare de absorbţie a electronilor pentru a obţine contrastul necesar). Astfel este facilitată evidenţierea detaliilor ultrastructurii celulare.

In prezent se folosesc diverse tipuri de microscoape electronice care diferă prin construcţie şi prin destinaţie (Manolescu et al, 1979; Ploaie şi Petre, 1979). Aceste microscoape au denumiri uzuale abreviate derivate din denumirile în limba engleză (acronimele respective).

Din pleiada acestor microscoape se menţionează:

- *Microscopul electronic de transmisie* - de tip TEM (Transmission Electron Microscope), care se pretează studiilor de ultrastructură a preparatelor biologice.
- *Microscopul analitic de transmisie* - tip TEAM (Transmission Electron Analytical Microscope), se utilizează în investigaţiile care urmăresc aspecte ultrastructurale şi analitice;
- *Microscopul electronic de baleiaj* - de tip SEM (Scanning Electron Microscope), utilizat în cercetarea ultrastructurii suprafeţelor prin efectul electronilor reflectaţi;
- *Microscopul electronic de transmisie şi baleiaj* - tip STEM (Scanning Transmission Electron Microscope), permite studiul ultrastructurii preparatelor prin transmisie de electroni şi al morfologiei suprafetelor prin electronii reflectaţi (secundari);
- *Microscopul electronic cu fotoemisie* - tip PEM (Photoelectron Emission Microscope), este folosit în studiul morfologiei suprafeţelor (ultramorfologie);

- *Microscopul electronic de microsondare* - tip EPI (Electron Probe Instrument) se pretează pentru cercetări asupra morfologiei suprafețelor și cercetări cu caracter analitic.
- *Microscopul ionic cu emisie de câmp* - tip FIM (Field Ion Microscope), este un instrument de mare performanța care permite și vizualizarea structurilor chimice din preparatele biologice.

In principiu, la toate microscoapele electronice imaginea se obține prin proiectarea pe preparatul biologic, a unui fascicul de electroni ca mijloc de iluminare care traversează sistemul de "lentile electromagnetice" al microscopului. Imaginea preparatului biologic (reprezentând o zonă redusă de câțiva zeci de microni pătrați) se proiectează pe ecranul fluorescent al microscopului electronic atâta timp cât este traversat de fasciculul de electroni.

Pentru studiul detaliat și interpretarea imaginilor electronomicroscopice ale preparatelor biologice, se efectuează în mod curent fotografii ale preparatelor. In acest scop microscoapele electronice sunt echipate și cu dispozitive de tehnică fotografică (în unele cazuri fiind chiar automatizate).

La anumite tipuri de microscoape electronice sunt atașate echipamente dotate cu plăci fotografice speciale (de sticlă sau celuloid). Pe plăci se află depusă o emulsie de halogenuri de argint (AgBr sau AgCl) în cantitate de 1 mg/cmc, având grosimea de 12 μm și granulația de 0,05-2,00 μm (mai adecvată fiind 0,5 μm). Uneori, cu scop protectiv fața de acțiunile abrazive, peste stratul de emulsie sensibilă se aplică un strat fin de gelatină (cu grosimea de cca. 1 mm). Emulsia de halogenuri este sensibilizată de electronii din fasciculul de electroni secundari (reflectați), de radiațiile X produse în emulsie.

Microscoapele electronice utilizate în prezent au rezoluții de 2-3 A și pentru anumite preparate, până la 1,2 A. Puterea de mărire a microscopului electronic (înregistrată pe placa fotografică 800.000x) depășește cu mult pe aceea a microscopului optic, ceea ce a permis efectuarea unor studii de anvergură asupra ultrastructurii celulare. Aceste studii au fost extinse, într-o etapă ulterioară, și la investigarea unor biomolecule (e.g.: aminoacizi, acizi nucleici ș.a.). Cu ajutorul microscopiei electronice a fost posibilă investigarea arhitectonicii ultrastructurilor celulare, dezvoltată îndeosebi după anii'70. Datele obținute s-au corelat și au confirmat informațiile obținute în biochimie prin metoda difracției cu raze X, analiza Fourier ș.a.

Performanțele realizate cu ajutorul electronomicroscopiei au contribuit la importante progrese realizate în domeniul biologiei celulare și moleculare.

In domeniul biologiei moleculare - interesând cadrul acestui volum - microscopia electronică a permis elucidarea unor aspecte referitoare la acizii nucleici. Spre exemplu, utilizându-se procedeele microscopiei electronice a fost posibilă pentru prima dată vizualizarea genelor bacteriene din Escherichia coli, după eliberarea DNA, prin șoc osmotic (Miller et al., 1970). De asemenea, imaginile electronomicroscopice au relevat faptul că la bacterii macromoleculele de DNA sunt atașate macromoleculelor de mRNA,

iar acestea din urmă ribosomilor. S-a estimat că aceste imagini au surprins, in facto, procesul de transcripţie.

Importante investigaţii s-au efectuat cu ajutorul microscopiei electronice şi asupra proceselor de hibridizare moleculară, recte a formării de heteroduplexuri (heterocatene) între acizii nucleici aparţinând unor organisme înrudite şi/sau diferite.

Astfel, prin studiul proceselor de hibridizare a acizilor nucleici, provenind de la organisme înrudite, s-a contribuit la deschiderea de noi orizonturi în domeniul taxonomiei moleculare.

În cazul studiului hibridizării acizilor nucleici, provenind de la organisme diferite (sau din organite celulare), microscopia electronică a făcut posibil progresul în domeniul tehnologiei DNA recombinant şi a patologiei moleculare.

În general, cercetările în domeniul biologiei celulare şi moleculare, bazate pe procedee microscopice, implică fracţionarea celulară, ultracentrifugarea materialelor biologice şi obţinerea preparatelor microscopice.

2.1.2.5. Procedee microscopice în studiul acizilor nucleici din celule

Investigarea acizilor nucleici celulari şi îndeosebi a DNA, prin procedee microscopice, prezintă interes pentru diverse domenii ale biologiei, medicinei şi farmacologiei. Progresele în acest domeniu au servit biologiei celulare, biologiei moleculare, patologiei biochimice, morfopatologiei, chimioterapiei etc. In acest context cercetarea ultrastructurii şi topobiochimiei nucleului celular la eucariote - în relaţie cu DNA - s-a făcut prin diverse procedee microscopice. Observaţii extrem de precise asupra nucleului se pot efectua pe celulele din ţesuturi prelevate prin biopsie sau studiate in vitro (în culturi de celule). Dintre procedeele microscopice, în cercetarea ultrastructurii şi funcţiei nucleului, o importanţă majoră au evidenţiat microscopia fotonică (îndeosebi prin tehnica în contrast de fază) şi microscopia electronică.

Informaţii interesante asupra ultrastructurii nucleare a adus microcine- matografia - o tehnică care permite studiul cineticii constituenţilor celulari. Astfel s-a observat existenţa unor granulaţii care vin frecvent în raport cu anvelopa (membrana) nucleară. In aceste momente nucleolul eliberează noi substanţe care ulterior traversează anvelopa nucleară (prin porii acesteia), pentru a ajunge în citoplasmă.

Studiul riguros al nucleului, ultrastructurii şi topobiochimiei acestuia se face cu ajutorul tehnicilor citochimice (respectiv histochimice) specifice procedeelor microscopice.

2.1.2.5.1. Procedee specifice citochimiei clasice

În cadrul procedeelor microscopice se utilizează diverse tehnici care fac posibilă vizualizarea ultrastructurii şi topobiochimiei nucleare. În acest sens se menţionează: fixarea şi colorarea ca tehnici specifice.

Fixarea preparatelor şi colorarea se face cu aplicarea unor tehnici de lucru bine verificate prin testare. In caz contrar există riscul de-a se obţine *artefacte* - generate de transformări citochimice care conferă (anumitor formaţiuni ultrastructurale ale celulei) un aspect cu totul diferit de realitate.

Fixarea - permite studiul nucleului în secţiuni de organe (evident şi de celule) prin fixare se realizează coagularea particulelor coloidale conţinute în materia vie. In acest sens intervin factori fizici şi chimici. Intre factorii fizici se menţionează temperatura, viteza de penetrare (e.g.: viteza de penetrare crescută în celulă are acidul acetic). Intre factorii chimici se menţionează compuşii cu efect oxidant, care se pot combina cu diverşi bioconstituenţi ai celulei.

Între compuşii oxidanţi utilizabili pentru fixare se menţionează: acidul acetic, aldehida formică, acidul picric, bicromatul de potasiu, cloroformul, alcoolul (care penetrează mai greu în celulă şi se utilizează de obicei în amestec). Un fixator eficient este tetraoxidul de osmiu (OsO_4).

Pentru studiul nucleului celular se folosesc diverse soluţii, în amestec, cum ar fi: soluţia Bouin (aldehida formică, acid picric, acid acetic); soluţia Helly (aldehida formică, bicarbonat de potasiu, sare de mercur).

Colorarea - este, de obicei, adaptată metodei de fixare. Se urmăreşte predilect colorarea nucleului şi evidenţierea acizilor nucleici prin tehnici simple şi tehnici specifice.

1) *Colorarea nucleară simplă* - în cazul acesteia se utilizează de obicei compuşi bazici (e.g.: albastru de metilen, verde de metil) sau unele substanţe, de origine vegetală, cu mecanism de acţiune mai puţin cunoscut (e.g.: hematoxilina).

2) *Colorarea nucleară specifică* - se utilizează pentru un studiu mai precis al bioconstituenţilor nucleului. Se consideră că astfel de colorații pot fi veritabile "teste biochimice".

In acest sens se menţionează câteva reacţii de culoare, specifice pentru acizii nucleici.

- *Reacţia cu albastru de toluidină* - este caracteristică pentru acizii nucleici din cromatină şi din nucleol. Specificitatea sa nu este bine delimitată. Din acest motiv se foloseşte un artificiu pentru *colorarea exclusivă a DNA*. Pentru aceasta se hidrolizează în prealabil tot RNA, utilizându-se ribonucleaza. Se procedează la spălarea preparatului, apoi se colorează DNA cu albastru de toluidină.
- *Reacţia Feulgen* - permite colorarea şi astfel localizarea directă a DNA. Din acest considerent este mai frecvent utilizată. In acest caz secţiunile de ţesuturi sunt tratate cu o soluţie de acid clorhidric, care produce hidroliza menajată a DNA fără depolimerizare. In aceste condiţii se produce eliminarea nucleobazelor purinice. Astfel se ajunge la DNA rezidual care conţine

doar nucleobaze pirimidinice (citozina şi timina). Se procedează în continuare la colorare cu *reactiv Schiff* - leucoderivatul fucsinei bazice, care se fixează pe catena de DNA cu conţinut de deoxiribozofosfaţi şi nucleobaze pirimidinice. In urma acestei interacţii reactivul Schiff îşi redobândeşte culoarea roşie-purpurie. Această reacţie, tipică în histochimie, este cunoscută sub numele de reacţia Feulgen. In cazul unor condiţii analitice constante această reacţie se pretează determinărilor cantitative prin metode spectrofotometrice. Valoarea histochimică a reacţiei Feulgen este relativ facil de probat: se utilizează în acest scop deoxiribonuclează; ţesutul prelevat tratat cu această enzimă nu se mai poate colora cu reactivul Schiff, pentru că DNA în astfel de condiţii este total hidrolizat.

- *Reacţia Brachet* - face posibilă, în acelaşi timp, colorarea diferenţiată a DNA şi RNA dintr-un nucleu celular. Reagentul utilizat conţine un amestec de verde de metil şi pirolină. Aplicată în condiţii riguroase această reacţie permite colorarea distinctă a DNA - în verde şi a RNA - în roşu.

Colorarea nucleară specifică - a făcut posibilă evidenţierea unor caracteristici topobiochimice specifice acizilor nucleici: cromatina nucleară, bogată în DNA - are reacţia Feulgen pozitivă, pe când nucleolii, bogaţi în RNA - dau reacţia Feulgen negativă.

2.1.2.5.2. Procedee specifice biologiei moleculare

În biologia moleculară, urmărind rigoarea experimentală, au putut fi studiate fragmente macromoleculare de DNA.

Investigarea macromoleculelor de DNA cu ajutorul microscopiei electronice a permis observarea formei de *DNA circular închis*, existentă la majoritatea organismelor. Noţiunea de "circular" în cazul catenei (lanţului) de DNA, relevă continuitatea. Aceasta este necesară in vivo pentru că asigură starea compactă - fapt descris la E.coli.

Fig. 2-4. Elecronomicroscopia DNA mitocondrial:(A) forma circulară relaxată; (B) forma circulară super-helicală

Nu în toate cazurile DNA este circular. Spre exemplu la bacteriofagul T7 molecula de DNA este lineară. In alte cazuri, cum ar fi bacteriofagul λ, s-a observat interconversia între formele lineară şi circulară.

In cazul moleculei de DNA circular s-a remarcat o torsionare a axei dublului helix, urmată de apariţia formei de *DNA superhelical*. Detorsionarea axei dublului helix cu menţinerea statusului "închis" este cunoscut sub numele de *DNA relaxat închis*. O reprezentare electronomicroscopică (prin electronomicrografie) a DNA din mitocondrie în diverse forme circulare (după Clayton - citat de Stryer, 1996) este redată în fig. 2-4.

Forma superhelicală este importantă din punct de vedere biologic din mai multe considerente : DNA superhelical reprezintă o formă mai completă în raport cu DNA relaxat; forma de DNA superhelical afectează capacitatea dublului helix de-a se desface (şi astfel denatura); această formă afectează interacţiile cu alte molecule.

Aspectele discutate mai sus reprezintă caracteristicile topologice ale DNA, importante în discutarea relaţiei structură chimică-activitate biologică.

2.1.2.5.3. Procedee specifice morfologiei si morfopatologiei

În microscopia modernă, perfectată prin îmbunătăţirea parametrilor bazaţi pe evaluarea particularităţilor fizico-chimice ale preparatului microscopic, se procedează la utilizarea tehnicilor microscopice morfometrice, care pot viza aspecte morfologice şi/sau morfopatologice privind ultrastructura celulei şi chiar aspecte topobiochimice (Baak, 1991).

Morfometria urmăreşte evaluarea cantitativă a unor formaţiuni ultrastructurale din celulă (e.g.: nucleu, mitocondrie) mergând uneori, până la constituenţi chimici (e.g.: DNA nuclear). In accepţia sa mai veche, termenul de *morfometrie* a fost asociat noţiunii de *morfologie cantitativă* (Weibel, 1969). Trebuie remarcat faptul că morfometria implică abordarea geometrică a particularităţilor ultrastructurale. In acest sens căile de abord se adresează: a) *planimetriei* - care permite evaluarea microscopică bidimensională (în plan, notată 2D); b) *stereometriei* (stereoscopiei) - prin care se poate proceda la evaluarea microscopică tridimensională (în spaţiu, notată 3D). In prezent utilizarea tehnicilor planimetrice şi stereometrice se face în cadrul unor procedee microscopice asistate de calculator.

Aplicaţiile morfometriei au depăşit cadrul cercetărilor de interes general, fiind utilizate pentru investigaţii curente de morfologie şi morfopatologie (Simionescu et al., 1974; Baak, 1991). Perfectarea tehnicilor de lucru a condus la delimitarea domeniului *citometriei microscopice* care s-a extins până la *cuantificarea DNA*. Se remarcă faptul că şi în acest caz se uzează de reacţia Feulgen. Colorarea fucsinică (specifică reacţiei Feulgen) este precedată de depurinificarea DNA dublu catenar prin hidroliza acidă cu HCl. Grupările aldehidice apărute în urma depurinificării permit o reacţie cantitativă (stoichiometrică) cu baza Schiff. Aceste particularităţi ale reacţiei Feulgen au condus la ideea standardizării unei tehnicic citologice.

In aplicarea tehnicilor citometrice pentru DNA se procedează la evaluarea statusului ciclului celular (proliferativ) pentru fazele: G_1 - presinteza; S - sinteza; G_2 - postsinteza; M - mitoza. Se menţionează şi posibilitatea existenţei unei faze Go - statice corespunzând unui status neproliferativ. Evident evaluarea acestui status se face pe un ţesut, astfel că se pot estima doar aspectele globale referitoare la citocinetică (cinetica ciclului celular).

Estimarea se face de fapt prin *citometria DNA* care permite relevarea datelor morfometrice printr-o reprezentare grafică specifică numită *histograma DNA*.

Din histograme se evaluează stările deiploide şi aneuploide (denumirile fiind preluate de fapt din genetică). In morfometrie se tinde tot mai mult spre crearea unei terminologii specifice, optându-se în acest caz pentru denumirea de linia-sursă a DNA (DNA-stemline).

Sub raport tehnic, în funcţie de modul de vizualizare a imaginii se disting: *citometria statică* (imagistică) - permite vizualizarea pe lama de sticlă şi *citometria dinamică* (în flux) - cu ajutorul căreia se vizualizează celule sau constituenţi celulari în dispersie apoasă având ca sursă de lumină un laser cu ioni de argon (lumină monocromatică cu λ aprox. 450-510 nm). Pentru evidenţierea DNA se folosesc fluorocromi de tipul ethidium bromid, propidium bromid, acridin orange cu mecanisme de intercalare (probabil formare de aducţi) la DNA şi/sau RNA. De asemenea, se pot folosi fluorocromi cu tropism pentru perechile de nucleobaze G-C, e.g.: nitramicină, ovomicină sau pentru perechile de nucleobaze A-T, e.g.: coloranţi produşi de frima Hoechst (patent). Utilizarea fluorocromilor a contribuit la perfectarea tehnicilor morfometrice.

In cercetările de biologie moleculară întreprinse prin procedee morfometrice asupra nucleului celular au arătat că există o anumită variaţie a cuantumului DNA în funcţie de sursa celulelor. Astfel, spre exemplu, în nucleul spermatozoidului DNA reprezintă cca 60%, iar în nucleul ovocitei cca 1%. pentru un anumit tip de celule proporţia DNA, RNA şi a proteinelor bazice sunt relativ constante.

In cazul cercetărilor asupra concentraţiei DNA nuclear la celule de la aceiaşi specie, valorile absolute prezintă similitudini. Exemplificând, la cocoş s-a constatat că în cazul nucleului celulei somatice cuantumul DNA nuclear este cca $2{,}5.10^{-9}$ mg, iar în cazul celulei germinale (spermatozoidul) cuantumul de DNA nuclear este de $1{,}26\cdot10^{-9}$ mg. Se observă că cifrele au un ordin de mărime asemănător.

În literatura de specialitate din limba română există două lucrări de referinţă cu privire la morfometrie (Taşcă , 1976; Olinici şi Vaida, 1997).

Tehnicile morfometrice sunt utilizate în cercetările de *morfologie* direcţionate spre citologie, histologie, biologie moleculară şi în investigaţiile cu profil de *morfopatologie* pentru prognosticul tumorilor, diagnosticul malignităţii, efectele metastazării, cercetarea efectelor chimioterapicelor citostatice etc.

2.1.3. METODE BIOCHIMICE

În biologia moleculară, ca şi în biochimie, se utilizează metode analitice chimice şi fizico-chimice. Cu referire la aceste metode se reiterează câteva aspecte de principiu.

Metodele *chimice*, considerate metode *directe*, permit efectuarea unor măsurători asupra masei de substanţă. În această grupă de metode se include gravimetria şi volumetria pentru lichide (i.e. titrimetria). Pentru obiectivele biologiei moleculare utilizarea acestor

metode este mai restrânsă şi interesează studiul bioconstituenţilor şi a topobiochimiei acestora.

Metodele *fizico-chimice*, denumite adesea metode *instrumentale* sau metode *indirecte*, se utilizează pentru determinarea unor proprietăţi de masă. Astfel de proprietăţi de masă sunt: transmitanţa (T%) şi/sau extincţia (E) - în fotometrie; factorul de retenţie (R_f) - în cromatografia în strat subţire; indicele de refacţie (n) - în refractometrie; potenţialul de semiundă ($E_{1/2}$) - în polarografie etc. Diversele mărimi determinate prin metode fizico-chimice (instrumentale) servesc la definirea compoziţiei şi structurii bioconstituenţilor, precum şi la evaluarea activităţii biologice.

În cazul unor investigaţii ştiinţifice de anvergură în domeniul biochimiei şi al biologiei moleculare - investigaţii în care primează interdisciplinaritatea obiectivelor programatice - se poate urmări relaţia structură chimică - activitate biologică.

Studiul materiei vii la nivel celular şi molecular a permis uzitarea diverselor metode biochimice, care reprezintă de fapt adaptări şi/sau perfecţionări ale metodelor analitice clasice, i.e. metodele chimice şi metodele fizico-chimice.

Literatura de specialitate din domeniul Biologiei moleculare relevă utilizarea unor metode analitice diverse, urmărimd investigarea bioconstituenţilor, a topobiochimiei acestora, a caracteristicilor dinamice ale materiei vii, a relaţiei structură - activitate SAR (Structure - Activity Relationship) a relaţiei cantitative structură - activitate QSAR (Quantitative Structure - Activity Relationship) etc.

Investigarea caracteristicilor dinamice ale proceselor biologice este extrem de importantă pentru biologia moleculară, biochimie, fiziologie, farmacologie ş.a. Pentru a înţelege acest fapt se reiterează câteva informaţii generale privind acest subiect.

Caracteristicile dinamice definesc biotransformările produse în organismele vii, de o manieră continuă interrelaţională, reversibilă şi/sau non-reversibilă. Aceste caracteristici dinamice sunt reprezentate de: a) metabolism; b) cronobiochimie; c) homeostazie; d) homeorezie (Gârban, 1993).

Metabolismul - reprezintă ansamblul transformărilor fizico-chimice complexe ale compuşilor chimici (exogeni şi endogeni) din organismul viu. Ca şi proces biologic, metabolismul este caracterizat prin două faze: catabolismul - totalitatea proceselor de biodegradare fiziologică a compuşilor de provenienţă exogenă şi endogenă; anabolismul - totalitatea proceselor de biosinteză fiziologică a moleculelor care vor reprezenta bioconstituenţii propriului organism. În metabolismul intermediar există o succesiune de interacţii specifice care definesc aşa numitele căi metabolice sau cu termen uzual căi biochimice (biochemical pathways). Aceste căi pot fi catabolice, anabolice, amfibolice. Privit în ansamblu metabolismul prezintă două particularităţi: specificitatea-caracterizată prin eficienţă chimică şi energetică şi prin condiţii blânde de temperatură, presiune şi pH; *universalitatea* - caracterizată prin mecanisme de biotransformare similare la microorganisme, plante, animale şi om.

Cronobiochimia - se defineşte prin variaţia cuantumului metaboliţilor datorat modificărilor biochimice şi fiziologice validate statistic, care prezintă un caracter ondulatoriu, reproductibil în anumite domenii de frecvenţă. La om aceste domenii de frecvenţă pot fi: ultradiene - cu durata de ordinul

secundelor, minutelor sau orelor, circadiene sau nictemerale - cu durata de aproximativ 24 ore (21-28 ore); infradiene - cu durata de ordinul zilelor, e.g.: hebdomadare (7 zile); circamensuale (o lună); circanuale (un an). Sub raport cronobiochimic cuantumul metaboliților este definit de parametri caracteristici: a) *perioada* - se definește prin durata unui ciclu complet de variație; b)*acrofaza* - corespunde unui maxim valoric ("pic") al concentrației, evaluate în timp, pentru un anumit metabolit luat în studiu; c) *amplitudinea* - este estimată prin retrasarea diagramatică a variațiilor cronobiochimice ale metabolitului luat în studiu (Reinberg, 1973; Gârban, 1984).

Homeostazia - se definește - largo sensu- prin capacitatea unui organism de a menține în anumite limite o stare "biologic normală", atunci când condițiile de mediu variază continuu. Ca și caracteristică dinamică, homeostazia prezintă două trăsături interrelaționale: *reglarea* (sau autoreglarea) *homeostazică* - succesiunea de procese care conduc la augmentarea, depresia sau anularea unor variații în funcționarea unui sistem; *echilibrul homeostazic* - alternanța de stări cu tendințe de echilibru.

Homeorezia (homeoresis) - reprezintă o caracteristică biologică definitorie pentru "echilibrul distabil" biochimic în complexul mamă-produs de concepție (embrion sau fetus). Existența echilibrului distabil este marcată printr-un schimb continuu de materie, energie și informație în complexul materno-filial. Prin homeorezie se realizează un echilibru dinamic sistemic, numit în teoria sistemelor "sistem autoisodiasostic" (Dioguardi, 1989). Studiul metaboliților în homeostazie a condus chiar la ideea existenței unui "anabolism de gestație" (Brätter, 1992). În echilibrul difazic statusul metaboliților are predilect și o condiționare nutrițională (Gârban, 1993). Statusul metaboliților este dependent de aportul exogen în principii nutritive și de procesele metabolice.

O privire de ansamblu asupra caracteristicilor dinamice ale proceselor biologice relevă implicarea majoră a acestora în biologia moleculară. Modificările metabolice, cronobiochimice, homeostazice și homeorezice - în anumite limite - sunt esențiale pentru organism. Perturbarea acestora este definitorie pentru patologia biochimică.

Aprofundarea și extinderea aplicațiilor analitice ale metodelor chimice și fizico-chimice în biologia moleculară este tributară cercetărilor inter- și multidisciplinare în care se regăsește aportul biochimiei, geneticii, microbiologiei, fizico-chimiei și fizicii (v. Cap.1.2.). Alături de acestea - cu o variată pondere, în evoluția cunoștințelor din domeniul Biologiei moleculare - se pot situa morfologia (citologia, histologia), morfopatologia, fiziologia, fiziopatologia, chimia cuantică, chimia computațională ș.a.

În acest cadru se observă în prezent tendința de demarcare metodologică în biologia moleculară, în sensul că se pot distinge aplicații bazate pe metode bichimice clasice (Oppenheimer, 1934; Gregoire, 1971; Davidson, 1972; Eichhorn, 1983; Kaplan și Pesce, 1984 etc.) și pe metode specifice biologiei moleculare (Hood, 1975; Cantor și Schimmel, 1980; Popa și Repanovici, 1982; Alberts et al., 1983; Darnell et al., 1986; Zarnea, 1986, Kruh, 1987; Edelman, 1988; Cajal, 1990; Rawn, 1991; Gârban, 1992; Davidson și Sittman, 1994; Mac Donald și Ford, 1997 etc.).

Dintre metodele biochimice clasice, cu aplicabilitate în biologia moleculară, se disting: metode analitice metabolice - bazate pe criterii fiziologice, e.g.: determinarea gazelor consumate și/sau eliberate de un țesut în cursul proceselor metabolice; metoda mutanților auxotrofi - bazată pe criterii genetice; metode radiochimice; metode spectrometrice (e.g.: spectrometria în UV, vizibil și IR); metode stereochimice denumite

adesea şi metode magnetochimice (e.g.: dicroismul circular, dipersia rotatorie optică); metode electrochimice (e.g.: electroforeza, potenţiometria) ş.a.

În continuare vor fi prezentate date generale privind *principalele metode biochimice* clasice cu aplicabilitate în biochimie şi biologia moleculară. Aceste metode au stat la baza perfecţionării *metodelor specifice biologiei moleculare*.

2.1.3.1. Metode analitice metabolice

Aceste metode au fost concepute şi aplicate în al doilea pătrar al secolului XX cu scopul de a decela transformările biochimice din ţesuturi.

În acest mod au fost studiate excizate (secţiuni) de ţesut hepatic - menţinute în mediu lichid (e.g.: soluţii tampon) de compoziţie bine cunoscută. Incubarea excizatelor tisulare se face la temperatură constantă (e.g.: 37°C) şi un timp precizat (e.g.: o oră) urmărindu-se modificările fiziologice consecutive proceselor metabolice.

Pe astfel de probe, spre exemplu, s-a putut urmări biotransformarea unui compus iniţial A până la un compus final N, pe o anumită cale metabolică, i.e. cale biochimică (biochemical pathway). În acest mod s-a putut observa apariţia unor derivaţi metabolici în diversele etape intermediare:

$$A \longrightarrow B \longrightarrow C \longrightarrow D \ldots\ldots \longrightarrow N$$

În astfel de studii, flacoane special adaptate, închise, racordate la mediul experimental şi la un manometru, permit măsurarea consumului de gaz (i.e. oxigen) şi/sau eliberarea de gaz (i.e. dioxid de carbon). Datele experimentale oferă informaţii asupra proceselor fiziologice şi a transformărilor biochimice.

Perfectarea metodologiei implică şi dozarea compuşilor iniţial (A), final (N) şi eventual a produşilor intermediari (B,C,D, etc.)

Tehnica aceasta prezintă însă unele incoveniente, între care se menţioneaza: a) cantităţile de compuşi studiaţi sunt reduse, ceea ce face dificilă dozarea la valori fiziologice; b) uneori nu se pot decela produşii cercetati deoarece se pierd, spre exemplu: compusul A poate evolua spre B şi C, dar - pe o cale secundară - se poate forma şi un produs B1, pentru care nu se ştie calea; c) adesea este dificilă stabilirea ordinei de apariţie a produşilor de transformare intermediari.

2.1.3.2. Metoda mutantilor auxotrofi

Metoda se bazează pe folosirea unor mutanţi genetici care pot induce erori în biosinteza unor enzime influenţând metabolismul intermediar. La baza metodei se afla

conceptul conform căruia fiecare genă controlează biosinteza unei enzime, respectiv relaţia "o gena - o enzimă" (Beadle şi Tatun, 1941). Studiile s-au efectuat pe microorgansime, în speţă pe fungul Neurospora crassa. In cazul iradierii speciilor de Neurospora cu raze X (agent mutagen fizic) se produc mutanţi care modifică biosinteza unor enzime (Kruh, 1987).

Astfel, o mutaţie survenită pe o genă poate provoca oprirea sintezei unei enzime active şi în acest mod oprirea unei succesiuni de reacţii. Organismele pentru care trebuie sa se furnizeze un compus suplimentar în scopul realizării unei biosinteze normale şi continue sunt grevate de prezenta aşa numiţilor mutanţi auxotrofi.

Se consideră cazul unui lanţ de interacţii (calea biochimică) în care apar metaboliţii X, Y, Z, U. Biotransformarea acestora este determinată de enzimele E_x, E_y, E_z, sau poate fi blocată de mutanţii m_1, m_2, m_3. Modelul unui lanţ metabolic controlat de enzime şi grevat de acţiunea mutanţilor auxotrofi este redat în fig. 2-5.

metaboliţi	X ⟶ Y	Y ⟶ Z	Z ⟶ U
	-	-	-
enzime	Ex	Ey	Ez
	-	-	-
mutanţi	m1	m2	m3

Fig. 2-5. Interrelaţia lanţ metabolic-enzime-mutanţi auxotrofi (explicaţii în text).

În această cale biochimică metabolică intervin trei enzime. Fiecare etapă poate fi grevată de apariţia unui mutant (m_1, m_2 sau m_3) ceea ce ar conduce la întreruperea căii biochimice, e.g.: apariţia mutantului m_2 poate opri biosinteza, metabolitului Z. Biosinteza acestuia însă poate fi continuată în cazul suplimentării (adăugării) compusului Y. Situaţia exemplificată atestă existenţa unui mutant auxotrof de tipul m_2.

Deci pentru ca reacţia să se desfăşoare este necesară prezenţa unui compus de suplinire a metabolitului care nu poate fi sintetizat datorită apariţiei mutantului şi care se află în "aval" în cadrul căii biochimice respective.

2.1.3.3. Metode izotopice

Administrarea unor "metaboliţi marcaţi" (care conţin în moleculă izotopi) se pretează la studiul transformărilor metabolice în organismul intact.

Primul experiment de "marcare chimică" s-a făcut de către Knopp (1904) care a introdus gruparea fenil în locul grupării metilice terminale a unui acid gras. Administraţi la animale, acizii graşi fenil-substituiţi au fost oxidaţi (biodegradaţi) prin îndepărtarea

succesivă a fragmentelor terminale din doi atomi de carbon. Acest studiu se afla la originea descoperirii β-oxidației și rolului acesteia în metabolismul lipidic.

Ulterior - odată cu dezvoltarea fizicii - s-au putut efectua experimente cu izotopi (nuclizi) care au un *număr atomic*- **Z** identic și *numere de masă* - **A** diferite. In cazul unui element oarecare X, nuclidul este:

$$^{A}_{Z}X \quad \text{exemplificându-se} \quad ^{16}_{8}O,\ ^{17}_{8}O,\ ^{18}_{8}O,\ ^{21}_{11}Na,\ ^{23}_{11}Na$$

In condiții naturale, elementele, în marea lor majoritate, se află sub formă de amestecuri izotopice. O parte din izotopi se pretează utilizării pentru așa numita "marcare izotopică". Una din primele observații cu astfel de compuși a fost efectuată asupra radioplumbului din plante, procedură fiind observație facilă pentru detectare. In prezent pentru cercetările biomedicale se utilizează *izotopi stabili* și/sau *izotopi radioactivi* (radioizotopi).

2.1.3.3.1. Utilizarea izotopilor stabili

Izotopii stabili se află în natură în cantități foarte reduse. Acești izotopi sunt caracterizati prin timpi de înjumătățire nemăsurabil de lungi. Pentru utilizare, compusul studiat este îmbogățit cantitativ cu unul din izotopii stabili ai unui element pe care-l conține. Spre exemplu, în cazul apei H_2O o parte din ^{1}H se înlocuiește prin ^{2}H sau D (deuteriu) obținându-se D_2O - apa grea sau apa deuterată.

Substanțele marcate cu izotopi stabili se obțin prin reacții de dublu schimb (numite reacții de schimb izotopic), sau prin reacții de sinteză în cursul cărora izotopul este introdus în produsul final.

Prezentarea principalilor izotopi stabili se face în tabelul 2-1. Pentru dozarea izotopilor din această grupă se folosește spectograful de masă. Precursorii izotopilor stabili (denumiți uneori și izotopi grei) se pot utiliza și pentru creșterea greutății moleculare. In acest mod se pot separa prin centrifugare macromoleculele sintetizate care conțin un precursor greu, de macromolecule identice preexistente în celulă (care nu conțin izotopul respectiv).

2.1.3.3.2. Utilizarea izotopilor radioactivi

Izotopii radioactivi (radioizotopii) - se obțin actualmente, în mod curent, în reactoarele nucleare. Celulele pot sintetiza compuși biochimici cu conținut de radioizotopi prin încorporarea acestora în anumiți precursori metabolici. In acest scop se administrează ex-

BCU "ASCENTIUS" UNIVERSITY LIBRARY

Tabel 2-1. Izotopi stabili de interes experimental

Izotop	Numere		Abundența naturală (%)	Masa izotopului
	A	Z		
^{1}H	1	1	99,986	1,0078
^{2}H	2	1	0,015	2,0141
^{12}C	12	6	98,892	12,0000
^{13}C	13	6	1,108	13,0033
^{14}N	14	7	99,635	14,0032
^{15}N	15	7	0,365	15,0001
^{16}O	16	8	99,759	15,9999
^{17}O	17	8	0,037	16,9991
^{18}O	18	8	0,204	17,9991

perimental la animale de laborator precursori metabolici (cu radioizotopi) sub formă injectabilă, lichide de perfuzie, sau ca ingredienți în rația alimentară. Administrarea în alimentație se poate face în consum "ad libitum" sau în concentrații bine stabilite "prin gavaj" (cu ajutorul unei microsonde). Utilizarea metodei gavajului asigură o evaluare mai riguroasă a produşilor de biosinteză rezultați "in vivo". De asemenea este posibilă introducerea unor precursori metabolici cu radioizotopi în mediile de cultură celulară în cazul experimentelor "in vitro".

Tabelul 2-2 prezintă principalii izotopi radioactivi care se pretează utilizării în experimentele biologice şi biomedicale. Administrarea se poate face şi în scop diagnostic (medicina nucleară).

Pentru evaluarea acțiunii acestor izotopi în radiochimie se utilizează noțiunea de activitate specifică, noțiune care exprimă raportul dintre numărul atomilor radioactivi şi numărul total al atomilor elementului respectiv, e.g.: $^{14}C/(^{14}C+^{12}C)$.

In biologie se utilizează notiunea de *activitate specifică*, care defineşte radioactivitatea unei biomolecule exprimată în milicurie (mCi) sau microcurie (μCi) redând dezintegrările pe minut sau pe unitate de greutate. Prin definiție un Curie (Ci) reprezintă cantitatea de substanță radioactivă care produce $3,7.10^{10}$ dezintegrări pe secundă.

Izotopii radioactivi în cercetările biologice se pot utiliza în diverse moduri. Se menționează mai detaliat unele utilizări:

– Injectarea unui anumit compus chimic marcat la animale de laborator şi urmărirea în timp, a biotransformărilor acestuia reprezintă un mod de cercetare "in vivo". Astfel, spre exemplu, după injectarea unui compus A conținând un radioizotop se urmăreşte transformarea acestuia în alți compuşi chimici B, C, D, E. Biotransformările A —> B —> C —> D —> E, se analizează prin determinarea activității specifice.

BCU "CAROL I" CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Tabel 2-2. Radioizotopi utilizaţi în experimente biologice

Radioizotop	Numere		Radiaţii emise	Energia maximă (MeV)	Timp de înjumătăţire ($T_{1/2}$)
	A	Z			
^{3}H	3	1	β^+	0,98	12,26 a
^{11}C	11	6	β^+, γ	0,098	20,3 m
^{14}C	14	6	β^-	0,15	5568 a
^{22}Na	22	11	β^+, γ	0,58/0,75	2,60 a
^{24}Na	24	11	β^+, γ	1,39/2,75	1,48 h
^{32}P	32	15	β^-	1,701	14,3 z
^{35}S	35	16	β^-	0,12-0,17	87,1 z
^{38}Cl	38	17	β^-, γ	1,16/1,64	37 m
^{42}K	42	19	β^+, γ	3,50/2,07/1,51	12,4 h
^{45}Ca	45	20	β^-	0,26	152 z
^{51}Cr	51	24	γ	0,322	278 z
^{55}Fe	55	26		0,0065	4 a
^{59}Fe	59	26	β^+, γ	0,26/1,10	47 z
^{58}Co	58	27	β^+, γ	0,485/0,810	71 z
^{90}Sr	90	38	β^+, γ	0,500	28,1 a
^{99m}Tc	99	43	γ	0,14	6,0 h
^{125}I	125	53	γ		
^{131}I	131	53	β^-, γ	0,595/0,367	8,0 z

Notă: Valoarea $T_{1/2}$ se exprimă în: minute (m); ore (h); zile (z); ani (a)

– Urmărirea biotransformărilor se poate face şi "in vitro" pe culturi care conţin excizate (secţiuni de ţesuturi). In astfel de experimente pentru un compus marcat A se poate urmări transformarea parţială (sub rezerva absenţei schimburilor izotopice, neglijabile în experienţele biologice) sau integrală a compusului. Metoda aceasta permite, prin determinarea tuturor compuşilor radioactivi, stabilirea mecanismelor complexe de reacţie.

– Autoradiografia - reprezintă o metodă bazată pe proprietatea radioelementelor de a impresiona suprafeţe fotografice sensibile. Prin localizarea compuşilor radioactivi în celule (ţesuturi) se pot detecta la microscop zonele impresionate ale suprafeţelor sensibile superpozate celular. In astfel de studii a fost utilizat spre exemplu "hidrogenul supragreu ^{3}H numit şi tritiu (T). Acesta, după administrare, emite particule de joasă energie care pot traversa o distanţă de cca. 1m, descompunând fiecare un singur cristal de sare de argint de pe placa fotografică. Pe placă apar granulaţii microscopice punctiforme. In aceasta manieră, spre exemplu, după injectarea unui compus A tritiat la animal, se poate afla în ce loc al

sinteza moleculei B (având ca precursor compusul A). Secţiunile din ţesuturi, recoltate după mai multe zile sau săptămâni de la administrare, sunt puse în contact cu suprafeţe fotosensibile. Ulterior, la microscop se observă granulele negre situate la locul sintezei moleculei B. Astfel de cercetări s-au efectuat asupra cromosomilor giganţi ai glandelor salivare la Drosophila, prin administrarea în mediu a unui precursor tritiat. Ulterior, în contact cu o suprafaţă fotosensibilă s-au sesizat zone în care se află RNA radioactiv - cu conţinut de ^{3}H provenit din precursorul administrat. Determinarea integrării izotopului în cursul biosintezei - pentru oricare produs studiat prin această metodă - se face prin evaluarea autoradiografiei.

2.1.3.4. Metode cromatografice

Cromatografia, metodă analitică (şi preparativă) descoperită de M. Tswet în 1906, este utilizată în separarea diferiţilor componenţi dintr-un amestec. Aplicată în studiul compuşilor biochimici cromatografia a făcut posibilă investigarea diverşilor metaboliţi de natură protidică, glucidică, ş.a.

In acest scop se pot utiliza diverse variante ale metodei, între care se disting: cromatografia pe coloană, cromatografia pe hârtie, ş.a.

2.1.3.4.1. Cromatografia pe coloană

Această metodă necesită folosirea de coloane cilindrice de sticlă umplute cu pulbere sau gel (e.g.: absorbant, schimbător de ioni) care reprezintă faza staţionară din "coloana cromatografică". După introducerea soluţiei cu amestecul de substanţe (în curs de cercetare) se procedează la separarea componentelor. Pentru aceasta se lasă să circule prin coloană un dizolvant (eluent), care reprezintă faza mobilă - fig.2-6.

A) Consideraţii generale

Considerăm că pe o coloana cromatografică se introduce o soluţie care conţine un amestec de substanţe (a+b+c). Acesta urmează a fi separat. Se introduce eluentul, care va determina separarea amestecului (a+b+c) în fracţiuni: a, b, c. Preluarea fracţiunilor separate se poate face automatizat, folosind un aparat special - colectorul de fracţiuni.

Selectarea eluenţilor folosiţi, a caracteristicilor fizico-chimice ale acestora reprezintă o chestiune de metodologie.

Cromatografia poate fi utilizată şi pentru analiza amestecurilor de substanţe prin înregistrare grafică. In acest caz coloana este "racordată" la un aparat de măsură care permite determinarea (într-o manieră continuă) şi, înregistrarea - sub forma unei curbe - a concentraţiei sau altui parametru (e.g.: radioactivitatea), caracteristic pentru compuşii eluaţi succesiv care traversează aparatul de măsură.

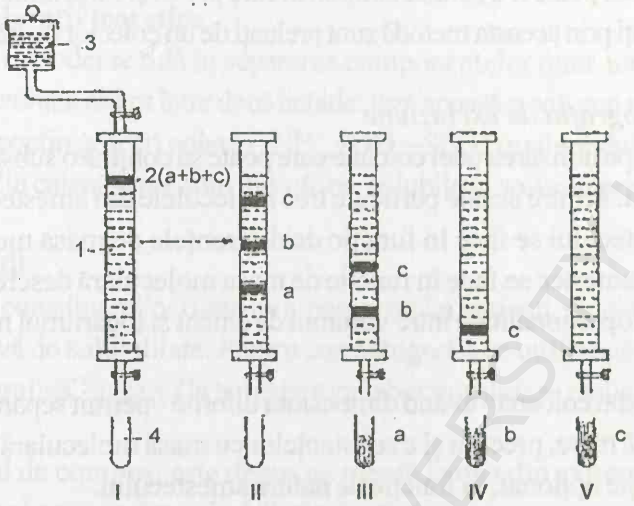


Fig. 2-6. Cromatografia pe coloană (reprezentare schematică)
I. 1) Coloana cromatografică (cu umplutură); 2) Amestecul de substanţe (a+b+c); 3) Rezervor cu eluent; 4) Colector de fracţiuni (una din eprubetele colectorului)
II. Detaşarea fracţiunilor pe coloană; III-IV. Colectarea fracţiunilor separate cromatografic : (a); b); (c)

B) Aplicaţii

In cromatografie problema esenţială rezidă în alegerea materialului de umplere a coloanei (suportul sau faza staţionară) şi respectiv a eluentului (faza mobilă). Sub acest raport se disting mai multe tipuri de cromatografie: a) cromatografia cu rezine schimbătoare de ioni; b) cromatografia de excluziune; c) cromatografia de afinitate.

a) Cromatografia cu rezine schimbătoare de ioni

Se utilizează în cazul existenţei unor interacţiuni electrostatice dintre eluent şi grupările fixate pe suport. Pentru acest tip de cromatografie se prepară polimeri solizi pe care se fixează grupe ionizabile cationice (e.g.: rezine sulfonice) sau anionice (e.g.: amine substituente). Aceste rezine sunt schimbătoare de cationi (e.g.: Na^+, K^+), respectiv de anioni (e.g.: Cl^- sau OH^-). In acest sens se exemplifică:

$R–C_6H_4–SO_3H^-–Na^+$	$R–C_6H_4–CH_2–N^+–(CH_3)_3Cl^-$
schimbător de cationi	schimbător de anioni
(derivat sulfonic)	(amină substituită)

Astfel de rezine pot fracționa un amestec de compuşi ionizați, a caror croma-tografiere se urmăreşte. Eluentul poate fi o soluție tampon la care pH-ul şi forța ionică variază în timp. Constituenții separați prin aceasta metodă sunt preluați de un colector de fracțiuni.

b) Cromatografia de excluziune

Se bazează pe utilizarea unei coloane care poate să conțină o substanță cu particule de mărime calibrată. Printre aceste particule trec moleculele din amestecul de substanțe. Fracționarea amestecului se face în funcție de diferențele de masa moleculară. Eluția constituenților din amestec se face în funcție de masa moleculară descrescândă: există o relație de inversă proporționalitate între volumul de eluent şi logaritmul masei moleculare a moleculei.

Particulele din coloană - având dimensiuni diferite - permit separarea substanțelor cu masa moleculară mare, precum şi a substanțelor cu masă moleculară redusă. Tipul de particule se stabileşte opțional, în funcție de natura amestecului.

c) Cromatografia de afinitate

Este utilizată în scop analitic sau preparativ pentru compuşi macromoleculari. Metoda se pretează izolării unei enzime dintr-un amestec. Pentru aceasta se foloseşte un compus inert (în stare pulverizată), pe care se fixează covalent, un substrat enzimatic. Amestecul de substanțe (conținând enzima E - care urmează a fi separată) traversează coloana cu excepția enzimei care se combină cu substratul. Apoi se foloseşte un eluent care eliberează enzima E, realizându-se astfel separarea din mediul inițial.

Metoda se pretează şi scopurilor preparative, pentru macromoleculele cu proprietăți bine definite. Astfel, se pot obține proteine din amestecuri complexe, e.g.: antigeni - fixând pe coloană anticorpi specifici; molecule receptoare pentru hormoni - fixând pe coloană hormoni. Tehnicile utilizate în cromatografia pe coloană s-au îmbunătățit prin folosirea particulelor foarte fine şi rezistente. Acestea au determinat creşterea suprafeței de schimb între coloană, moleculele fracționate şi eluent.

O astfel de tehnică este cromatografia lichidă de înaltă performanță - HPLC (High Performance Liquid Cromatography). Se lucrează în circuit închis şi la presiune crescută. In acest mod s-a diminuat considerabil durata cromatografiei crescând eficacitatea şi rezoluția.

2.1.3.4.2. Cromatografia pe hârtie

Este o metodă în care faza staționară este reprezentată de o hârtie de filtru obişnuită sau preparată prin impregnare cu absorbanți e.g.: hârtia tip Schleicher-Schüll, Whatman ş.a.

A) Consideraţii teoretice

Aplicarea metodei rezidă în separarea componentelor dintr-un amestec pe baza coeficientului de rezoluţie diferit între două lichide: faza apoasă şi solvenţi neapoşi (organici). Compuşii studiaţi conţin grupări polare (–NH_2, –OH, –SO_3H) mai solubile în apă şi grupări nepolare (–CH_2 - din catenă) care sunt hidrofobe, solubile în solvenţi organici.

B) Aplicaţii

Separarea constituenţilor dintr-un amestec (acizi aminaţi, glucide ş.a.) se bazează pe diferenţa relativă de solubilitate. Pentru cromatografie se utilizează o incintă închisă "camera cromatografică" în care (la temperatura laboratorului) se realizează o atmosferă saturată cu vapori.

Amestecul de compuşi este depus cu pipetă la una din extremităţile hârtiei de filtru speciale, locul aceasta devenind "linia de start" a cromatogramei. Compuşii din amestec străbat hârtia prin capilaritate şi se separă datorită coeficienţilor de repartiţie diferiţi. Prin acţiunea unui solvent organic (sau amestec de solvenţi) "distanţa de migrare" a fiecărui constituent diferă. Aceasta este cu atât mai mare cu cât solubilitatea relativă este mai crescută (deci o directă proporţionalitate). Distanţa de migrare a solventului (developantului) este denumită şi "frontul developantului". In funcţie de modul de dispunere a solventului, cromatografia poate fi: descendentă, ascendentă şi circulară.

Dacă amestecul analizat are o compoziţie complexă, separarea se face defectuos. In acest caz se preferă cromatografia (pe hârtie de formă pătrată) în două etape: 1) monodimensională (iniţială); 2) bidimensională (după rotirea cu 90° a hârtiei). In cromatografia bidimensională se obţin de fapt două cromatograme perpendiculare. Exemplificarea cromatogramelor se face în fig. 2-7.

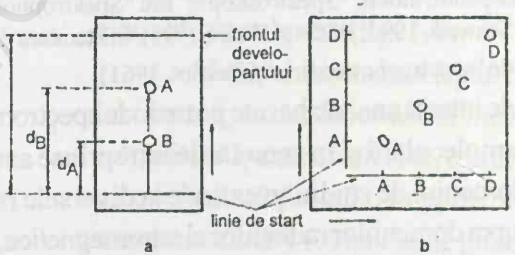


Fig. 2-7. Cromatografia pe hârtie - principalele tipuri de cromatograme
Cromatograma monodimensională (a) şi bidimensională (b)

Cromatograma monodimensională face posibilă o caracterizare a fiecărui compus separat, pe baza raportului R_f dintre distanţa de migrare a fiecărui compus şi a developantului (aşa numitul "front de migrare" sau "front al developantului"). Spre exemplu, pentru compuşii A şi B se calculează:

$$R_f = \frac{d_A}{d_d} \qquad R_f = \frac{d_B}{d_d}$$

în care: d_d - distanţa de migrare a solventului (frontul developantului)

d_A, d_B - distanţele de migrare a compuşilor A şi B

După cromatografiere este posibilă şi relevarea spoturilor (zonelor de depunere a substanţelor). Relevarea implică reperarea riguroasă a compuşilor. Aceasta se poate face pulverizând o substanţă care colorează spoturile cromatografice corespunzătoare compuşilor.

De asemenea, este posibilă, în cazul spoturilor cu compuşi radioactivi, aplicarea procedeului autoradiografiei prin expunerea pe o suprafaţă radiosensibilă.

2.1.3.5. Metode spectrometrice

Metodele *spectrometrice* sau *spectroscopice* prezintă importanţă majoră pentru chimia-fizică şi chimia analitică (Murgulescu şi Sahini, 1978; Kuwana, 1978; Schwedt, 1992), având aplicabilitate în biochimie şi biologia moleculară. Aceste metode se pretează utilizării atât pentru analiza calitativă cât şi pentru analiza cantitativă.

Terminologia de "metode spectrometrice" este justificată de diversitatea tehnicilor analitice incluse în grupul acestor metode. In literatura de specialitate din limba română se foloseşte mai frecvent denumirea "metode spectroscopice" (spectroscopie), dar şi aceea de "metode spectrometrice"(spectrometrie) – utilizată şi în această carte. In literatura de specialitate din limba engleză se află cu denumirea de "spectrometry", dar şi aceea de "spectroscopy"(Kuwana, 1978; Metzner, 1987). In literatura germană se utilizează denumirile de "Spektrometrie" - utilizată pentru atomi, "Spektroskopie" sau "Spektrophotometrie" - utilizate pentru molecule (Hesse et al., 1979; Schwedt, 1992; Häder şi Häder, 1993). In literatura de limbă franceză denumirea frecvent utilizată este aceea de "spectrophotométrie" (Charlot, 1961).

În investigaţiile de interes analitic bazate pe metode spectrometrice cu aplicabilitate în biochimie şi biologie moleculară şi în cercetările întreprinse asupra problematicii din patologia moleculară, domeniul de studiu se extinde la diversele radiaţii. Pentru a avea o imagine de ansamblu asupra domeniilor radiaţiilor electromagnetice, în fig.2-8 se prezintă o diagramă a acestora cu menţionarea lungimilor de undă specifice.

Cunoaşterea tipurilor de radiaţie electromagnetică, a proprietăţilor generale ale acestora şi a naturii energiei atomice şi moleculare permite o mai bună înţelegere a

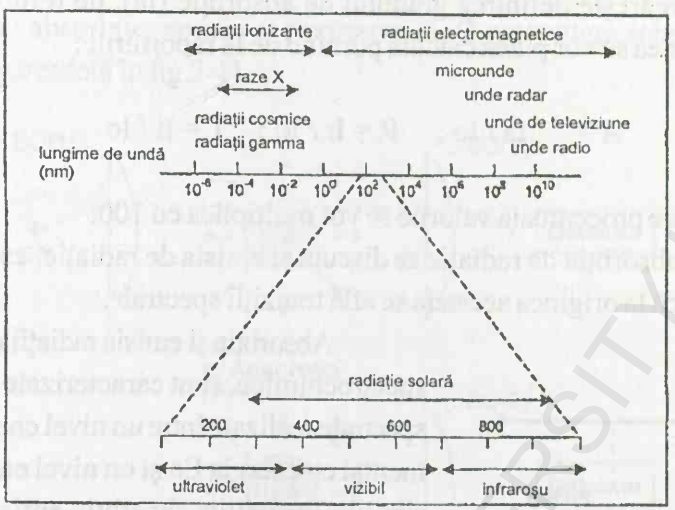


Fig. 2-8. Lungimile de undă specifice diverselor radiații (reprezentare generală)

specificului metodelor spectrometrice. In acest sens se menționează și câteva aspecte legate de caracterul dual (i.e. de undă și particulă al radiațiilor electromagnetice).

Fenomenele de difracție, interferență, polarizare, reflexie și refracție - demonstrate experimental - evidențiază caracterul de undă (ondulatoriu) al radiației electromagnetice. Studiul fenomenelor de absorbție și de emisie între diferite nivele energetice ale atomului au permis explicitarea naturii radiațiilor în termeni de particule (fotoni).

Dualitatea undă-particulă a fost definită de Louis de Broglie (1924).

Pentru a explicita problemele generale ale spectrometriei considerăm cazul unei radiații electromagnetice din domeniul vizibil, de intensitate I_o, care străbate o cuvă cu o soluție colorată (fig. 2-9).

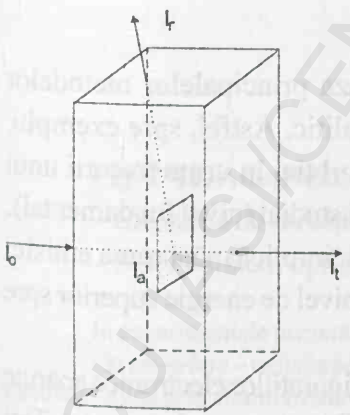


Fig. 2-9. Traversarea unei cuve cu soluție de către o radiație

Vom putea remarca faptul că intensitatea radiației incidente I_o se modifică astfel încât o parte a radiației de intensitate I_a este absorbită, o altă parte de intensitate I_r este reflectată și numai în parte radiația de intensitate I_t este transmisă. Prin calcul se poate arăta că intensitatea radiației luminoase incidente, însumează restul valorilor:

$$I_o = I_a + I_r + I_t$$

BCU IASI/CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Dacă se urmăreşte definirea gradului de absorbţie (Ia), de reflexie (Ir) şi de transmisie (It), acestea se vor putea calcula pornind de la raporturile:

$$A = Ia / Io ; \quad R = Ir / Io ; \quad T = It / Io$$

Pentru redare procentuală valorile se vor multiplica cu 100.

Alături de absorbţia de radiaţie se discută şi emisia de radiaţie, asocierea fiind motivată de faptul că la originea acesteia se află tranziţii spectrale.

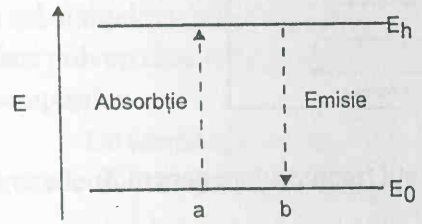


Fig. 2-10. Tranziţii spectrale
a. Absorbţia; b: Emisie

Absorbţia şi emisia radiaţiilor, ca procese spectrochimice, sunt caracterizate prin tranziţii spectrale realizate între un nivel energetic fundamental cu energia Eo şi un nivel energetic superior Eh. Tranziţiile absorbţie-emisie,prezentate schematic în fig. 2-10, redau cazul unei radiaţii de aceeaşi frecvenţa (n). Diferenţa de energie între cele două nivele este:

$$\Delta E = E_h - E_o = h \cdot \nu$$

Cum diferenţa de energie se găseşte integral sub forma de energie radiată, mai exact sub forma cuantelor de frecvenţă ν, se poate scrie:

$$\nu = (E_h - E_o)/h$$

Procesele amintite, explicitate sumar, stau la baza principalelor metodelor spectrometrice (spectroscopice) utilizate în domeniul analitic. Astfel, spre exemplu, *spectrometria de absorbţie* se bazează pe măsurarea absorbţiei în urma trecerii unui fascicul radiant eliberat în banda de rezonanţă a elementului studiat (nivel fundamental).

Spre deosebire de aceasta, *spectrometria de emisie* implică măsurarea emisiei rezultate ca urmare a revenirii electronilor excitaţi de la un nivel de energie superior spre nivelul fundamental.

Spectrele atomice sunt generate de modificările configuraţiilor electronice apărute la nivelul electronilor din straturile externe ale unor atomi din substanţa de cercetat. Trei experimente distincte permit definirea tipurilor de spectrometrie atomică pornind de la

BCU "LUCIAN BLAGA" CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

fenomenele de: absorbție, emisie și fluorescență. O prezentare schematică a acestor experimente este redată în fig.2-11.

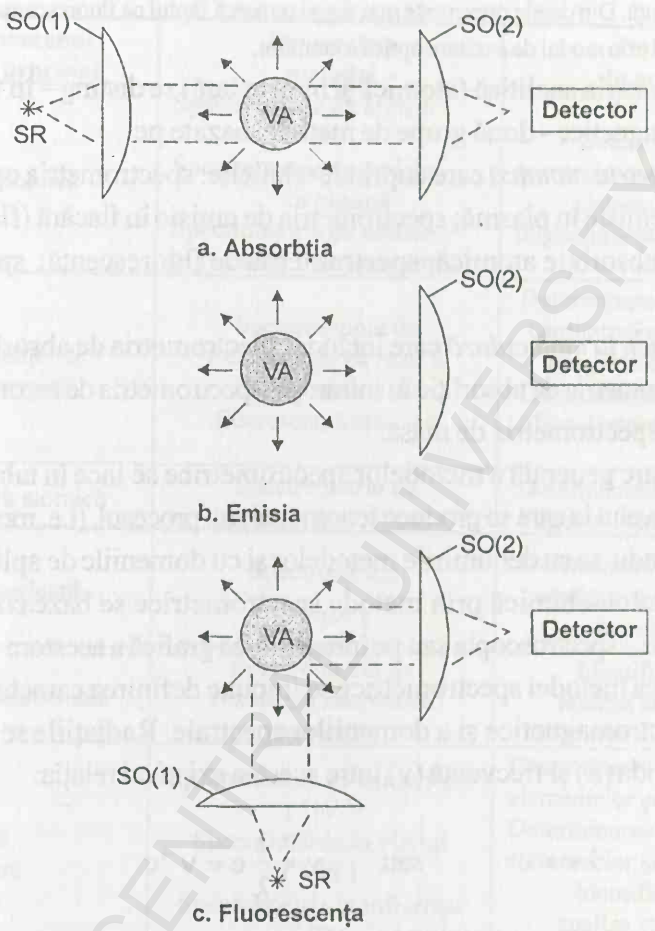


Fig. 2-11. Absorbția, emisia și fluorescența - reprezentare schematică
SR-sursa de radiații; VA-vaporizare atomi; SO(1)-sistem optic inițial;
SO(2)-sistem optic extern sursei (final)

In experimentele prezentate, de o manieră schematică, se remarcă următoarele particularități:

- în *absorbție* – radiația produsă de o sursă la temperatură înaltă - uzual realizată prin descărcarea electrică - trece prin atomii în stare de vaporizare. In această situație se măsoară atenuarea intensității sursei de radiație, explicitată prin absorbția fotonilor

- în *emisie* – atomii excitați sunt produși, în principal, prin "coliziunea" atomilor aflați în starea fundamentală cu specii de electroni, atomi sau molecule existente într-o stare energetică superioară – în gaze la temperatură înaltă, în scânteie sau în arc electric. Excitarea optică a atomilor este non-selectivă.

BCU IASI CENTRALA UNIVERSITY LIBRARY

- în *fluorescenţă* – radiaţia produsă la temperatură înaltă – de către o sursă externă - trece prin atomii în stare de vaporizare, ca şi în cazul absorbţiei, dar detectorul este astfel expus încât nu poate primi radiaţia de la sursa primară. Astfel, o fracţiune din atomii aduşi în stare de excitare optică, prin absorbţie trec, în final, la starea fundamentală prin emisie spontană de fotoni. Această reemitere a radiaţiei reprezintă semnalul de fluorescenţă. Din datele prezentate mai sus se remarcă faptul că fluorescenţa atomică diferă de emisia atomică, numai prin modul de excitare optică a atomilor.

În spectrometria analitică (atomică şi moleculară) se disting – în funcţie de sursa radiaţiei electromagnetice - două grupe de metode, bazate pe:

- *spectrometria atomică* care cuprinde tehnicile: spectrometria optică de emisie; spectrometria de emisie în plasmă; spectrometria de emisie în flacără (flamfotometria); spectrometria de absorbţie atomică; spectrometria de fluorescenţă; spectrometria cu raze X;

- *spectrometria moleculară* care include: spectrometria de absorbţie în ultraviolet şi vizibil, spectrometria de absorbţie în infraroşu; spectrometria de rezonanţă magnetică nucleară (RMN), spectrometria de masă.

O prezentare generală a metodelor spectrometrice se face în tabelul 2-3 în care se evidenţiază şi nivelul la care se produce fenomenul sau procesul, (i.e. molecular, atomic, nuclear) coroborându-se cu denumirile metodelor şi cu domeniile de aplicaţie.

Analiza fizico-chimică prin metode spectrometrice se bazează pe măsurarea variaţiilor spectrale – spectroscopia sau pe înregistrarea grafică a acestora – spectrografia.

In utilizarea metodei spectrometrice se impune definirea caracteristicilor fizice ale radiaţiilor electromagnetice şi a domeniilor spectrale. Radiaţiile se caracterizează prin lungime de undă (λ) şi frecvenţă (ν) între acestea existând relaţia:

$$\lambda\nu = c \qquad \text{sau} \qquad \nu = \frac{1}{\lambda}c = \nu^{-1}c$$

în care: c - viteza luminii în vid ($2{,}99793 \cdot 10^8$ m/s)

$1/\lambda$ - număr de undă (notat şi prin ν^{-1})

Energia radiaţiei electromagnetice (E) este dată de expresia:

$$E = h\nu$$

în care: h - constanta Planck ($6{,}67 \cdot 10^{-34}$ J.s)

Privind cadrul general al metodelor spectrometrice şi importanţa aplicativă a acestora în biologia moleculară şi biochimie, se poate considera că există câteva direcţii

Tabel 2-3. Metode spectometrice utilizate în analiza fizico- chimică cu aplicaţii în chimie, biochimie, biologie moleculară

Fenomenul sau procesul	Denumirea metodei	Domenii de aplicaţie
Emisia atomică	Spectrometria de emisie în arc Spectrometria de emisie în plasmă Spectrometria de emisie în flacără (flamfotometria)	Determinarea macroelmentelor metalice Determinarea oligoelementelor metalice
Fluorescenţa de emisie atomică	Spectroscopia de fluorescenţă cu raze X Spectrometria de fluorescenţă atomică	Determinarea calitativă şi cantitativă a elementelor mai grele decât azotuş Determinarea cantitativă a oligoelementelor metalice
Absorbţia atomică	Spectrometria de absorbţie atomică	Determinarea cantitativă a oligoelementelor metalice
Emisia nucleară	Spectrometria cu raze γ	Determinarea calitativă şi cantitativă a diverselor oligoelemente
Absorbţia nucleară	Spectrometria de rezonanţă magnetică nucleară	Identificarea şi analiza structurală a compuşilor organici
Absorbţia moleculară	Spectrometria în ultraviolet (UV) Spectrometria în vizibil (VIS) Spectrometria în infraroşu (IR)	Determinarea cantitativă a elementelor şi compuşilor Determinarea cantitativă a elementelor şi compuşilori Identificarea şi analiza structurală a compuşilor organici
Fragmentarea moleculară (structurală)	Spectrometria de masă	Identificarea şi analiza structurală a compuşilor organici

de interes major. In acest sens se menţionează utilizarea predilectă a patru metode spectrometrice: 1) de absorbţie; 2) de emisie; 3) cu raze X.; 4) de fluorescenţă. Aceste metode vor fi prezentate, sumar, în continuare.

BCU IASI CENTRUL UNIVERSITAR LIBRARY

2.1.3.5.1. Spectrometria de absorbtie

Noţiunea de "spectrometrie de absorbţie" desemnează o metodă fizico-chimică al cărei principiu este următorul: un fascicul de lumină de o anumită lungime de undă traversează un mediu e.g. o soluţie (uneori un gaz sau un corp solid) în scopul analizei chimice. Din proporţia luminii absorbite de soluţie se poate deduce concentraţia substanţei absorbante.

Metoda se bazează pe modificarea intensităţii radiaţiei electromagnetice la traversarea unui mediu, datorită fenomenului de absorbţie. Acest fenomen are aplicabilitate în spectrometria atomică dar şi în spectrometria moleculară.

In funcţie de domeniul lungimii de undă al luminii incidente folosită pentru analiză, e.g. radiaţii X, radiaţii ultraviolete (UV), vizibile, infraroşii (IR), se defineşte tipul de spectrometrie, i.e.: spectrometria cu raze X, spectrometria în UV etc. In modificarea intensităţii radiaţiei incidente mai pot fi implicate fenomenele de reflexie şi difuzie.

Pentru cercetările care privesc biochimia şi biologia moleculară majoritatea metodelor bazate pe spectrometria de absorbţie interesează predilect domeniul vizibil între lungimile de undă de cca 700-350 nm (spectrul ROGVAIV : roşu, oranj, galben, verde, albastru, indigo, violet) şi domeniile conexe, deci infraroşu (IR) şi ultraviolet (UV):

domeniul IR	R O G V A I V	domeniul UV
$\lambda > 700$ nm	700 nm > λ > 350 nm	$\lambda < 350$ nm

Metoda cunoscută, în general, cu denumirea de spectrometrie de absorbţie, se întâlneşte citată în literatură şi sub alte denumiri cum ar fi: spectroscopia de absorbţie, spectrofotometria de absorbţie, absorbţiometria, fotometria, spectrocolorimetria şi chiar sub numele impropriu de colorimetrie. Denumirea de "colorimetrie" este considerată improprie pentru faptul că este ambiguă. O metodă colorimetrică are ca scop doar specificarea şi descrierea culorilor (Charlot, 1961).

Spectrometria de absorbţie – ca metodă fizico-chimică de interes analitic – prezintă aplicabilitate vastă în diverse domenii ale biochimiei şi biologiei moleculare, precum şi în chimia clinică, chimia alimentară, chimia farmaceutică, toxicologie etc.

A. Consideraţii teoretice

In spectrometrie se evaluează relaţia dintre intensitatea radiaţiei incidente (I_0) şi a radiaţiei transmise (I_t) la traversarea unei cuve în care stratul de substanţă are lungimea (λ) - v. fig. 2-12a. Dacă o radiaţie luminoasă I_0 traversează o soluţie colorată, este absorbită culoarea complementară. In cazul utilizării unei radiaţii monocromatice I_0, corespunzătoare culorii soluţiei, absorbţia este diminuată în parte.

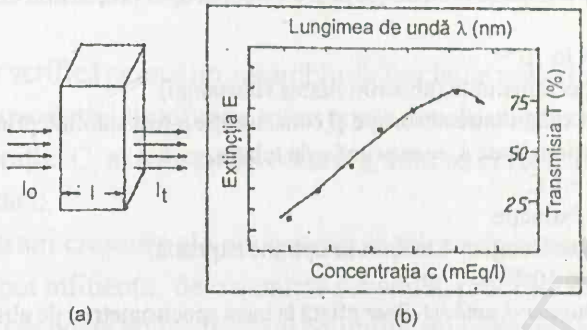


Fig. 2-12. Modificările intensității radiației și curba etalon în spectrometria de absorbție.
a) Modificările intensității radiației la traversarea mediului;
b) Corelația concentrație-extincție (transmisie) în spectrul substanței dozate

Relația dintre valorile intensităților (incidentă Io și transmisă It) este dată de legea Bouguer-Lambert-Beer. Formalismul matematic al acesteia se poate reda astfel:

$$I_t = I_o \cdot 10^{-\varepsilon C l}$$

în care: ε - coeficientul de extincție
C - concentrația substanței în soluție
l - distanța (lungimea) parcursă de radiația care traversează mediul (e.g. soluția).

Problema absorbției radiațiilor în raport cu grosimea (i.e. lungimea) l a stratului de absorbant a fost studiată de Bouguer, care în 1729 a enunțat existența unei relații calitative de inversă proporționalitate. Ulterior, Lambert, în 1760, a încercat o formulare mai riguroasă arătând că: într-un mediu absorbant grosimi (i.e. lungimi) de straturi identice, absorb fracțiuni similare din radiația incidentă. Aceasta se poate reda prin relația: (Io-Ii)Io, care exprimă statusul absorbției radiației incidente Io într-un anumit strat Ii și care este independentă de valoarea inițială, deci de Io. Aceste observații făcute de Bouguer și Lambert au condus ulterior la formularea legii Bouguer-Lambert.

Deducerea unei expresii matematice privind relația dintre intensitatea absorbției (Io) și grosimea (lungimea) mediului absorbant (l) are în vedere caracterul diferențial al mărimilor, astfel că poate fi redat prin expresia:

$$dIo = - k\, Io\, dl$$

în care : k - coeficient de absorbție

După separarea variabilelor și integrare între limitele Io și It, respectiv 0 și l se obține:

$$\ln It / Io = - k\, l$$

care se poate scrie și sub forma:

$$It = Io\, e^{-kl}$$

sau, în logaritmi zecimali:

$$\log It / Io = - 0,4343\ k\ l$$

In această relaţie, dacă se înlocuieşte prin e valoarea 0,4343k, se află expresia *legii Bouguer-Lambert:*

$$It = Io\ 10^{-al}$$

în care:a - factor de proporţionalitate (absorbtivitatea substanţei).

Existenţa unei relaţii între absorbţie şi concentraţie a fost stabilită prin *legea Beer*, conform căreia factorul de proporţionalitate a, se exprimă prin relaţia:

$$a = \varepsilon C$$

în care: ε - coeficient de extincţie

Inlocuind în legea Bouguer-Lambert se opbţine expresia:

$$It = Io\ 10^{-\varepsilon C \lambda}$$

care reprezintă *legea Bouguer-Lambert-Beer* aflată la baza spectrometriei de absorbţie.

Legea Bouguer-Lambert-Beer este definitorie pentru oricare mediu omogen absorbant (gaz, lichid sau solid) şi pentru oricare lungime de undă. Evident în biochimie şi biologia moleculară importanţă prezintă predilect, determinările efectuate predilect în mediu lichid (soluţii).

Constanta de proporţionalitate e este numită uzual coeficient de extincţie. Dacă exprimarea concentraţiei C se face în grame / litru (g/L), constanta e este numită *coeficient de extincţie specifică.*

In situaţia în care concentraţia C este exprimată în molecule gram / litru (M/L) constanta ε este numită *coeficient de extincţie molară.*

In toate cazurile valoarea e este dependentă de natura substanţei absorbante, de lungimea de undă, de temperatură şi, în principiu, independentă de solvent.

In spectrometria de absorbţie s-au stabilit două noţiuni cu care se operează în domeniul analitic:

- *transmisia* (transmitanţa) T care se defineşte prin raportul intensităţilor şi se exprimă de obicei în procente :

$$T = 100\ .\ I / Io \qquad (\%)$$

- *extincţia* (E) sau densitatea optică (DO) - se exprimă prin logaritmul raportului inversat al transmitanţei şi este o mărime adimensională :

$$E = \log\ I / Io \qquad \text{(adimensional)}$$

Validarea legii Bouguer-Lambert-Beer implică anumite condiţii. Această lege se verifică cu rigoare doar în condiţii ideale:

a) Lumina utilizată trebuie să fie monocromatică. Dacă această condiţie nu se realizează, pentru două lungimi de undă vecinale λ_1 şi λ_2 apare:

BCU IASI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

$$\log Io / I = e\lambda_1 \cdot l \cdot C \qquad \text{şi} \qquad \log Io / I = e\lambda_2 \cdot l \cdot C$$

Legea nu se verifică pentru un ansamblu de fascicule policromatice în care pot să apară $e\lambda_1$ şi $e\lambda_2$. Intr-o astfel de situaţie nu se poate decela un maxim al absorbţiei;

b) Concentraţia C a substanţei colorate, care se cercetează, nu trebuie să fie prea ridicată;

c) Concentraţii crescute ale unor săruri incolore, în absenţa tuturor reacţiilor chimice, pot influenţa, de o manieră sensibilă, procesul de absorbţie;

d) Legea nu se poate aplica în cazul soluţiilor fluorescente sau a suspensiilor;

e) Pot exista variaţii aparente foarte importante ale absorbţiei, dacă diluţia deplasează sensibil echilibrele chimice. Această situaţie se întâlneşte destul de frecvent.

Aplicarea spectrometriei de absorbţie se pretează şi în cazul determinărilor în soluţii incolore (e.g.: evidenţierea modificărilor spectrale în UV). In acest context se menţionează faptul că numeroşi compuşi de interes biologic (bioconstituenţi, metaboliţi, medicamente, aditivi farmaceutici şi alimentari) permit investigarea datorită absorbţiei în UV. Metodele spectroscopiei în UV au fost continuu extinse în ultimii ani.

B. Aplicaţii

Spectrometria de absorbţie se aplică în mod curent, pentru trei scopuri: a) dozarea de compuşi; b) măsurarea vitezei de reacţie; c) identificarea de compuşi. Detalii asupra acestora se prezintă în cele ce urmează.

a) Dozarea de compuşi. Din datele expuse mai sus s-a văzut că există o relaţie de proporţionalitate între extincţia E şi concentraţia c a unei soluţii (cazul folosirii unei radiaţii care este absorbită de soluţie). Pentru dozarea unei substanţe prin spectroscopia în UV, spre exemplu, se utilizează cuve speciale din sticlă de cuarţ, care sunt transparente la ultraviolete. Aducerea unui compus biochimic în stadiul de soluţie în vederea dozării implică aplicarea unei succesiuni de operaţii la sfârşitul cărora se face măsurarea extincţiei E sau transmisiei T(%).

Pentru dozare se folosesc aparate de construcţie specială: *spectrofotometre* - la care datele analitice se citesc pe scala aparatului, apoi se reprezintă grafic; *spectrografe* - care trasează direct "spectre" sau "spectrograme" - folosite ulterior la calculul datelor analitice. In cazul măsurătorilor soluţia cu probă (substanţa de determinat) se pune într-o cuvă şi se evaluează (prin citire sau în spectru) raportându-se cu o soluţie martor.

In prealabil se face etalonarea aparatului folosind substanţa de determinat pură (pro analisi) în soluţii de concentraţii diferite (gradient de concentraţie). Cu ajutorul acestor soluţii se trasează curbe

etalon (v. fig. 2-10b) care ulterior sunt folosite la dozare. Concentraţia (C) a substanţei (i.e. compusului dozat) se poate afla din curba reprezentată în spectrogramă, aceasta redându-se ca o funcţie:

$C = f_1 \cdot (E)$ sau $C = f_2$ (T%)

în care: E - extincţia (mărime adimensională)

T - transmisia (mărime exprimată în procente)

Utilizând curba etalon şi rezultatele analitice se poate stabili concentraţia substanţei a carei dozare se urmăreşte. Se face remarca, că în cazul aplatizării curbei etalon - a apariţiei unui palier - dozarea pierde din precizie devenind imposibilă.

b) Măsurarea vitezei de reactie. Aplicaţiile spectroscopiei în acest domeniu vizează predilect reacţiile enzimatice. O astfel de reacţie se traduce prin transformarea unei substanţe considerate substrat (S) într-un produs de reacţie (P) în care intervine enzima (En).

Intermediar se formează un complex de tipul substrat-enzimă (S-En). In reacţie se mai iau în vedere şi constantele de viteză (k_i):

$$S + En \underset{k_2}{\overset{k_1}{\rightleftharpoons}} S\,En \xrightarrow{k_1} P + En$$

Dacă compuşii S şi P sunt colorati sau pot fi coloraţi cu un reactiv (special ales) devine posibilă dozarea înainte şi după reacţia unuia din aceşti compuşi. Astfel, se poate obţine diferenţa de cantitate pentru compusul S care dispare, respectiv pentru compusul P care apare în reacţie.

In unele cazuri compuşii S şi P pot absorbi radiaţiile ultraviolete. In alte cazuri reacţia poate fi operaţională adesea fără actiunea altor reactivi. Din aceste considerente s-a conceput realizarea reacţiei în interiorul cuvei spectrofotometrului. Se pot determina astfel, în regim continuu, cuantumul compuşilor S şi P, prin variaţia extincţiei (E). De asemenea, se poate determina concomitent cinetica reacţiei. Variaţia extincţiei în funcţie de timp poate fi înregistrată obţinându-se direct spectrul care redă viteza de reacţie.

c) Identificarea de compuşi. Această aplicaţie se datorează faptului că numeroşi bioconstituenti izolaţi din preparate biologice au spectre caracteristice. Existenţa acestora semnifică faptul că substanţele biologice absorb diferite radiaţii într-un mod care diferă de la o substanţă la alta.

Se poate exemplifica în acest sens absorbţia radiaţiilor UV la 260 nm de către acizii nucleici şi la 280 nm de către proteine (datorită îndeosebi aminoacizilor aromatici din constituţia acestora) - fig. 2-13.

Aplicaţiile pentru identificarea de compuşi sunt deosebit de importante în cazul nucleobazelor provenite din nucleul heterociclic purinic, i.e.: adenina (A) şi guanina (G) şi din nucleul heterociclic pirimidină, i.e.: citozina (C), timina (T),şi uracilul (U). Nucleele heterociclice au structuri aromatice cu duble legături care explică existenţa absorbţiei la o lungime de undă mai mică decât 300 nm (deci în domeniul UV).Se remarcă faptul că

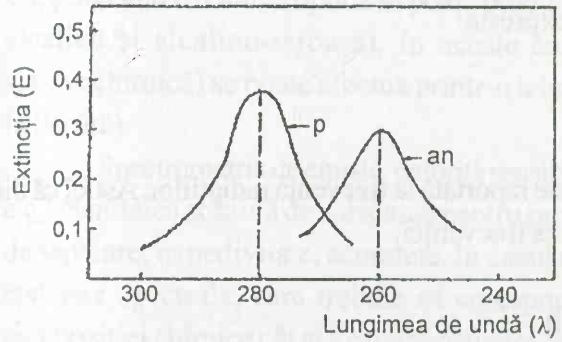


Fig. 2-13. Spectre de absorbție în ultraviolet

fiecare nucleobază (bază azotată heterociclică), are un spectru de absorbție specific şi că toate spectrele prezintă un maxim de absorbție în proximitatea lungimii de undă de 260 nm. Această proprietate este de asemenea valabilă pentru mononucleotide, deoarece pentoza (riboză sau dezoxiriboză) şi fosfatul, nu absorb radiațiile la aceste tipuri de undă.

Observațiile cu privire la nucleobaze au permis extinderea cercetărilor ştiințifice privind: α) măsurarea concentrației soluțiilor de acizi nucleici (e.g. o unitate de absorbanță corespunde la o concentrație de 50μg/mL DNA sau la o concentrație de 40μg/mL RNA ; ß) evaluarea purității unei soluții de acizi nucleici (având în vedere faptul că proteinele absorb radiația la lungime de undă mai mare, cca 280 nm – vezi şi fig. 2-13 – este posibilă decelarea contaminării cu proteine); γ) studiul relației denaturare – renaturare în condițiile modificărilor de temperatură (v. Cap.3.7 .)

Pentru identificare se pot utiliza aparate automate în care lungimea de undă (λ) a radiației incidente variază continuu, iar extincția (E) se înregistrează sub forma unei curbe. In acest mod se obține direct spectrul substanței studiate. Pentru evaluarea spectrului se utilizează fie "spectre etalon" (obținute de experimentator cu substanțe chimic pure), fie cataloage speciale cu "spectre standard" şi cu menționarea condițiilor de lucru (mediu de dizolvare, temperatură etc.).

2.1.3.5.2. Spectrometria de emisie

Spectrometria de emisie se pretează folosirii pentru determinarea calitativă şi cantitativă a bioelementelor şi a elementelor cu potențial toxicogen. In acest scop se face interpretarea spectrelor de emisie ale elementelor chimice luate în studiu.

A. Considerații teoretice

Spectrul de emisie pentru un atom oarecare se obține prin excitarea optică a acestuia în stare de vapori, când este adus la starea energetică superioară (E_h). In fine,

prin revenirea la starea inițiala (E_0), diferența de energie (ΔE) se va transforma în energie radiantă. Valoarea acesteia este dată de expresia:

$$\Delta E = E_h - E_0 = h\nu$$

Energia fotonilor sau cuantelor este raportată la frecvența radiațiilor. Astfel că din relația de mai sus se poate calcula valoarea frecvenței:

$$\nu = (E_h - E_0) / h$$

sau pornind de la relația $\lambda\nu = c$ se poate afla mărimea lungimii de undă (λ):

$$\lambda = c / \nu = h\,c / E_h - E_0$$

Emisia se poate produce în diferite domenii ale spectrului, deci la diverse lungimi de undă (IR, vizibil şi UV). Realizarea emisiei are loc la temperaturi ridicate, situație în care combinațiile sunt disociate emițând spectre atomice sau nucleare.

B. Aplicații

In domeniul analitic, spectroscopia de emisie (analiza spectrochimică) este utilizată pentru detecția calitativă (identificarea) metalelor sau nemetalelor - îndeosebi a oligoelementelor. De asemenea, se utilizează pentru determinări cantitative.

In laborator se utilizează aparate speciale denumite spectrometre, care constructiv prezintă trei părți: a) sursa de excitare optică sau sursa de lumină; b) sistemul de dispersie; c) receptorul de radiații.

Spectrometrele, în funcție de modul de receptare a radiațiilor, pot fi de două tipuri: 1) spectroscoape - care permit determinări vizuale directe sau mediate de fotomultiplicatoare; 2) spectrografe - cu ajutorul cărora spectrul se înregistrează grafic pe placa fotografică sau pe monitorul unui computer.

Pentru analiza spectrochimică potentialul de ionizare are o mare importanță. Sensibilitatea analizei spectrale va fi mai mare în elementele cu energie de ionizare scăzută şi invers. In condiții speciale fiecare bioelement poate fi excitat şi determinat prin analiza spectrochimică. In mod curent, indiferent de proveniență (biosferă, litosferă etc.), este posibilă determinarea pe cale spectrochimică a cca. 75 elemente.

Există situații în care potențialele de ionizare sunt destul de reduse (e.g.: Na, K,

Cs, ş.a.) când excitarea optică se poate produce la temperatura flăcării (cazul metalelor alcaline şi alcalino-teroase). In aceste cazuri *spectroscopia de emisie* (analiza spectrochimică) se poate efectua printr-o tehnică specială-*flamfotometria* (fotometria în flacără).

Spectrometria de emisie, datorită sensibilităţii analitice crescute - prezintă avantaje, e.g.: cantitatea scăzută de substanţă pentru proba analitică; lipsa unor etape preliminare de separare, expedivitate, acurateţe. In cazul acestei metode se impune utilizarea unor etaloane spectrale, care trebuie să corespundă probelor analitice atât sub raportul compoziţiei chimice cât şi a caracteristicilor fizice.

Metoda aceasta a dat rezultate foarte bune în investigarea bioelementelor din diverse produse biologice şi a permis stabilirea aşa numitelor "metalograme" importante atât pentru biologia moleculară cât şi pentru patologia biochimică. De asemenea metoda a permis determinarea metalelor, îndeosebi a oligoelementelor metalice, cu potenţial toxicogen.

2.1.3.5.3. Spectrometria cu raze X

In cadrul radiaţiilor electromagnetice se includ şi radiaţiile cu lungime de unda 10^{-2}-10^{2} A, denumite cu un termen generic "raze X". Acestea au implicaţii analitice importante (îndeosebi razele cu λ între 0,06-20,00 A). La baza acestui tip de spectroscopie se află fenomenele de: a) absorbţie; b) emisie; c) difracţie cu raze X.

A. Consideraţii teoretice

Cunoaşterea particularităţilor legate de aplicaţii implică explicitarea cadrului teoretic şi mai apoi aplicativ al fenomenelor care caracterizează razele X.

a) *Absorbţia razelor X.* Este un fenomen atomic, independent de starea chimică a atomului absorbant. Astfel absorbţia este independentă de starea de agregare în care se află elementul cercetat sau de faptul că se află în combinaţie anorganică sau organică, fiind dependentă doar de numărul atomilor.

In acest caz legea Bouguer-Lambert-Beer se redă prin relaţia:

$$\log I_o/I_t = \mu.l$$

în care: μ - coeficient de absorbţie linear, pentru un fascicul cu secţiunea de 1 cm^2.

l - grosimea stratului de substanţă.

Pentru determinările cantitative se utilizează radiaţia X monocromatică, absorbţia stabilindu-se cu ajutorul unui spectru (spectrograme) de raze X.

b) *Emisia razelor X.* Acest fenomen atomic, ca şi precedentul, este independent de starea fizică sau chimică a atomului studiat. In analiza de emisie cu raze X, spectrul probei este caracterizat printr-un fond continuu de linii spectrale.

Analizele calitative se bazează pe determinarea lungimilor de undă ale liniilor spectrale, iar analizele cantitative pe separarea, identificarea şi determinarea radiaţiilor. Metoda prezinta acurateţe şi expeditivitate, dar se pretează îndeosebi determinărilor de interes tehnic.

c) *Difracţia razelor X.* Difracţia reprezintă o metodă fizico-chimică de acurateţe a cărei utilizare s-a extins şi la investigarea structurilor moleculare şi/sau atomice ale bioconstituenţilor celulari. Metoda a fost elaborată în 1912 de Max von Laue şi utilizată pentru studiul cristalelor. Dezvoltată în anii '30-'40 de W.H. Bragg (tatăl) şi W.L. Bragg (fiul), metoda a permis ulterior obtinerea de informaţii asupra structurii şi configuraţiei moleculare a diferitelor biomolecule.

Datorită lungimii de undă mici a radiaţiilor X, acestea se pretează utilizării pentru studiul moleculelor şi atomilor permiţând evaluarea legăturilor interatomice.

In cazul unui fascicul de raze X (monocromatice) care traversează straturile succesive ale atomilor sau moleculelor dintr-un cristal poate avea loc difracţia acestor raze. Difracţia are loc în cazul în care lungimea de undă (λ) a razelor X este de acelaşi ordin de mărime cu distanţele interatomice sau intermoleculare din cristalul studiat (fig.2-14). Existenţa unor planei paralele de atomi sau molecule echidistante pe care fasciculul de raze X vine sub un unghi θ, face ca razele reflectate de planele atomice sau moleculare să interfere.

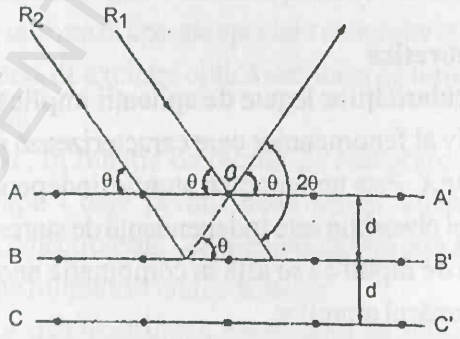


Fig. 2-14. Difracţia razelor X în straturile succesive dintr-o reţea cristalină

Diferenţa de drum a doua radiaţii, notate R_1 şi R_2 este reprezentată de porţiunea OO'(v. fig. 2-14), poate fi de ordinul λ/2 - situaţie în care radiaţiile se pierd prin interferenţă,

sau poate fi de ordinul unui multiplu întreg al lungimii de undă, deci ν_i - situație în care pot să apară maxime de interferență. Această ultimă situație, caracteristică apariției maximelor de interferența, este definită de legea Bragg și exprimată prin relația:

$$n\lambda = 2d \cdot \sin\theta$$

în care: n - ordinul difracției (multiplu întreg al lungimii de undă)
λ - lungimea de undă a radiațiilor X
d - constanta reticulară (distanța între două plane succesive de atomi sau molecule)
θ - unghi de difracție

In general, se poate afirma că prin dispunerea unui cristal în toate pozițiile unghiulare posibile (în raport cu radiațiile X), se obține o imagine caracteristică a substanței studiate reprezentată prin diagrama Debye - Scheerer (fig. 2-15).

Fig. 2-15. Diagrama Debye-Scherer (reprezentare schematică)

Fiecare substanță chimică, în stare cristalină, are o distanță caracteristică între planele reticulare (i.e. constanta reticulară). Această constatare explică diferențele între diagramele obținute de la diverse substanțe. Substanța chimică studiată poate fi: a) monocristal, care se rotește uniform în dreptul fasciculului de raze X, provocând astfel modificarea continuă a unghiului de incidență; b) o pulbere cristalină, care conține cristale având toate orientările posibile și permițând astfel obținerea diagramei Debye-Scheerer.

Studiile de difracție cu raze X au fost efectuate îndeosebi pe substanțe în stare de pulberi cristaline. Radiația X incidentă este dispersată de pulbere sub forma unor conuri (fig. 2-16). Aceste conuri - cu o rază centrală pe direcția fasciculului radiațiilor X incidente, pot fi înregistrate pe un ecran (placă fotografică) sub forma unor cercuri concentrice.

Imaginile obținute relevă faptul că radiațiile X sunt împrăștiate de atomii substanțe. Prin așa numita "analiză Fourier" se poate evalua densitatea de electroni r (x). Acest procedeu a permis obtinerea unor profiluri diferite ale densității de electroni pentru substanțele cercetate și a făcut posibilă explicitarea unor mecanisme de interacție în sistemele biologice.

BIBLIOTECA CENTRALA UNIVERSITY LIBRARY

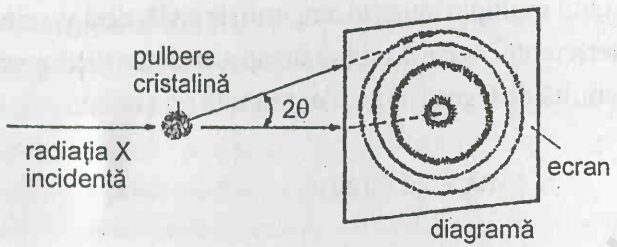


Fig. 2-16. Difracția razelor X în pulberi cristaline

Intensitatea radiației X reflectată este dependentă de calitatea speciei moleculare cristaline luată în studiu. Cuantificarea acestei intensități este criteriul care stă la baza analizei cantitative.

B. Aplicații

a) *Spectrometria de absorbție cu raze X* - se pretează utilizării când elementul de dozat este unicul component greu al probei. Absorbția este aditivă, astfel că se pot determina global mai multe elemente din probă. Metoda are utilizări îndeosebi în industrie (e.g.: tetraetilplumbul în benzină, adaosurile în uleiurile industriale, aditivi, mase plastice, etc.)

b) *Spectrometria de emisie cu raze X* - este utilizată pentru determinări de compoziție a oțelurilor aliate și a altor diverse aliaje. Metoda se pretează și pentru analiza urmelor arheologice, a resturilor meteoritice, a operelor de artă etc. Determinările pot merge până la limite de 10^{-14} g, metoda utilizându-se chiar pentru analize de mostre care nu pot fi distruse din motive de conservare.

c) *Difracția cu raze X* - se aplică în identificarea și studiul structurii substanțelor cristaline. Această metoda - numită și difractometrie cu raze X- a permis definirea structurilor și configurației unor biomacromolecule cum ar fi: mioglobina, colagenul, oxihemoglobina, acizii nucleici, carboxipeptidazelor ș.a. Remarcabile investigatii s-au efectuat asupra acizilor deoxiribonucleici (Franklin și Gosslin, 1951; Wilkins, 1952; ș.a.), care ulterior au condus la definirea structurii secundare de dublu helix (Watson și Crick, 1953).

Cu ajutorul spectrelor de difracție cu raze X s-au efectuat numeroase cercetări în perioada 1950-1970, urmărindu-se caracteristicile unor constituenți chimici celulari ai unor particule ultrastructurale, rezultate în urma distrucției celulare a diverselor țesuturi (Holmes și Blow, 1965).

BCU IASI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Pentru a exemplifica spectrele de difracţie se redau două imagini, reprezentând spectrele pentru spermă şi pentru DNA obţinute în perioada de început a acestor cercetări - preluate după Haggis (1967) şi redate în fig. 2-17.

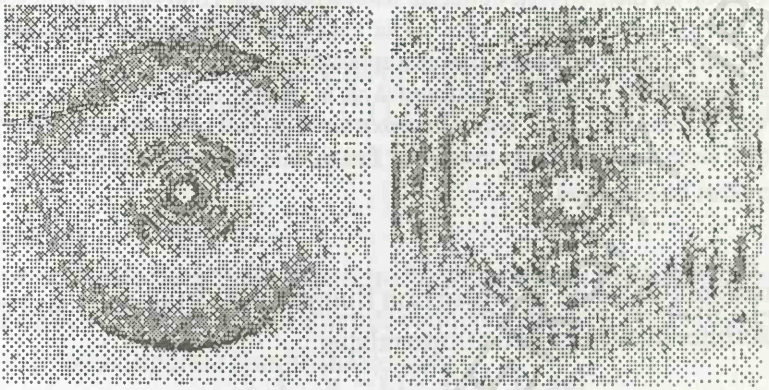


Fig. 2-17. Spectre de difracţie cu raze X.
(a) Sperma (după Wilkins, 1956, citat de Hagis, 1967);
(b) DNA (după Langridge et al., 1957 - citat după Hagis, 1967)

Accesibilitatea acestor metode a permis, alături de analiza Fourier, o extindere a limitelor explorării bioconstituenţilor de la nivel celular, molecular şi chiar atomic. Metoda difracţiei cu raze X s-a folosit în biologia moleculară la studiul diverşilor bioconstituenti cu localizare în nucleu, organite şi membrana celulară.

2.1.3.5.4. Spectrometria de fluorescentă

Spectrometria de fluorescenţă sau spectrofluorimetria reprezintă o metodă de elecţie utilizată în scopuri analitice pentru substanţele care prezintă fluorescenţă.

Fluorescenţa se defineşte prin fenomenul emisiei de lumină sub acţiunea unei radiaţii absorbite. Durata emisiei este egală cu durata absorbţiei.

Substanţele fluorescente de fapt reemit, în caz de iluminare, radiaţii cu lungimi de undă superioare în raport cu radiaţia luminii incidente (absorbite). Acest fapt este explicitat de observaţia că o parte din energia absorbită este consumată prin ciocnirile dintre molecule, astfel că energia disponibilă pentru fluorescenţă este mai redusă decât energia absorbită (principiul Stokes).

Pentru înţelegerea fenomenului de fluorescenţă se impune cunoaşterea aspectelor generale privind luminiscenţa. Fenomenul de luminiscenţă a fost remarcat de Stokes în 1852, prin notificarea faptului că mineralul "fluorit" aşezat la lumina solară dobândeşte o strălucire (luciu) aparte. Astfel de proprietăţi au fost sesizate ulterior şi la alte substanţe.

Conceptul de *luminiscenţă* defineşte fenomenele care conferă un "luciu specific" anumitor substanţe. In funcţie de mecanismul care stă la baza acestor fenomene se disting *fluorescenţa* şi *fosforescenţa* care prezintă importanţă şi pentru aplicaţiile analitice.

Fără a intra în alte detalii se menţionează că, în general, compuşii fluorescenţi şi fosforescenţi conţin un grup electron-donor (e.g.: amină, hidroxil alcoolic, heteroatomi) sau legături multiple conjugate (e.g.: inele aromatice). Prezenţa grupărilor funcţionale carboxilice şi aminice cauzează, în mod obişnuit, pierderea fluorescenţei.

A. Consid...

Intensitatea luminii re-emise prin fluorescenţă (I_f) se corelează cu intensitatea luminii absorbite- incidente (I_o) conform relaţiei:

$$\log kI_o / (kI_o - I_f) = \varepsilon \cdot l \cdot C$$

în care: k – coeficient dependent de natura substanţei studiate, natura solventului şi a temperaturii

ε – coeficient de extincţie (specifică sau molară)

l - distanţa străbătută de radiaţie în soluţia substanţei luate în studiu (exprimată în cm)

C – concentraţia substanţei (exprimată în g / L sau în M / L)

Urmărind valoarea intensităţii luminii emise prin fluorescenţă I_f se remarcă faptul că aceasta se poate exprima ca o funcţie în relaţie cu concentraţia (C) a substanţei:

$$I_f = f(C)$$

Imaginea curbei este redată în fig. 2-18. Se observă faptul că la concentraţii scăzute I_f este proporţională cu concentraţia. Odată cu creşterea concentraţiei substanţei se observă că I_f tinde asimptotic către kI_o. Deci, se poate constata că peste o anumită concentraţie I_f devine constantă. În cazul existenţei unor substanţe străine în soluţia luată în studiu intensitatea radiaţiei emise prin fluorescenţă poate varia în următoa-rele situaţii:

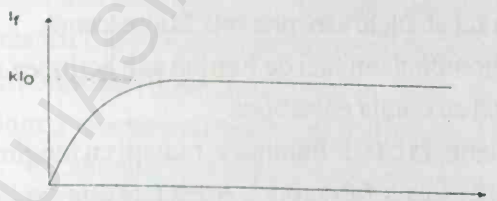


Fig. 2-18. Variaţia intensităţii radiaţiei emise prin fluorescenţă în funcţie de concentraţia substanţei

a) Substanţele străine absorb, mai mult sau mai puţin, fasciculul incident sau fasciculul emis;

b) Substanţele străine pot reacţiona cu compusul fluorescent. Astfel poate să apară un alt compus (e.g. un complex) a cărui fluorescenţă este mai redusă decît a compusului iniţial. Astfel, s-a remarcat faptul că fluorescenţa redusă a ionului Tl^+ poate fi crescută prin adăugirea în sistem a unui compus care prin disociere eliberează ioni de Cl^- care vor complexa compusul care conţine Tl^+.

c) Oligoelementele din compoziţia diverselor substanţe pot avea rol inhibitor asupra fluorescenţei, e.g. I^-, SCN^-, Cl^-, $C_2O_2^{2-}$, SO_4^{2-}, NO^{3-}, Cu^{2+}, Fe^{2+}. Astfel de ioni depresează valoarea fluorescenţei.

B. Aplicaţii

Spectrometria de fluorescenţă (spectrofluorimetria sau fluorimetria) se utilizează ca o metodă analitică selectivă, pentru anumite elemente chimice. Pentru determinările de fluorescenţă se folosesc aparate numite fluorometre.

Spectrul de fluorescenţă prezintă asemănări cu spectrul de absorbţie datorită faptului că fluorescenţa reprezintă re-emisia radiaţiei absorbite. Spectrul de fluorescenţă apare la lungimi de undă mai mari - fapt explicitat de principiul Stokes - în raport cu spectrul de absorbţie corespunzător.

In chimia anorganică metoda spectrofluorimetrică este utilizată mai frecvent pentru dozarea ionilor metalici în stare de complecşi organici fluorescenţi, în soluţie apoasă sau după extracţia acestora. De asemenea această metodă se pretează utilizării în studiul heteroproteidelor.

In prezent există o tendinţă generală de orientare spre analiza non-radioactivă a biomoleculelor. In laboratoarele de biochimie şi biologie moleculară s-a extins utilizarea metodelor non-radioactive preferându-se, îndeosebi, spectrometria prin fluorescenţă (i.e. metoda spectrofluorimetrică). Prin această metodă se pot studia diverse proteine şi acizii nucleici.Pentru astfel de studii se folosesc aşa numitele "protocoale pas cu pas" (engl. "step-by-step protocols") în care se detailează modul operator în astfel de analize.

2.1.3.6. Metode stereochimice

Utilizarea metodelor stereochimice în biologia moleculară implică existenţa unei "stări de chiralitate". Chiralitatea este realizată de un efect fizic de natură chirală sau de prezenţa unei substanţe chimice, a cărui edificiu molecular are o structură chirală (Crabbé, 1965).

Chiralitatea moleculară se apreciază în raport cu trei elemente geometrice: punct, axă, plan. Se remarcă existenţa unor tipuri distincte de chiralitate: centrală, axială, planară. Un caz aparte întâlnit în natură, dar mai puţin studiat, este chiralitatea helicoidală.

In studiile stereochimiei asupra bioconstituienţilor moleculari (şi îndeosebi macromoleculari) un important rol au metodele fizico-chimice bazate pe măsurătorile de

activitate optică. Intre acestea se menţionează *dicroismul circular* (DC), *dispersia optică rotatorie* (DOR), *polarometria* ş.a.

Pentru măsurarea activităţii optice se utilizează radiaţia circular polarizată, compusă din două vibraţii perpendiculare aflate una în raport cu cealaltă la o diferenţă de lungime de undă de ordinul $\lambda/4$. Cele două componente ale radiaţiei plan polarizate reprezintă de fapt radiaţiile circular polarizate: spre dreapta - cu rotire în sens orar şi spre stânga - cu rotire în sens antiorar. Prin suprapunerea radiaţiilor circular polarizate (în secţiune transversala - cercuri) se formează radiaţia linear polarizată (în secţiune o dreaptă). Deci, cu alte cuvinte, radiaţia linear polarizată este echivalentă cu rezultanta a două raze circular polarizate caracterizate prin aceeaşi intensitate şi viteză de propagare, dar cu sensuri opuse.

A. Consideraţii teoretice

In cazul unui câmp electric care oscilează sinusoidal, se poate defini un vector variabil $\vec{E}$. Acest vector este rezultanta a doi vectori de lungime egală: $\vec{E}_D$ - vectorul undei circular polarizate la dreapta; $\vec{E}_S$ vectorul undei circular polarizate la stânga (fig. 2-19).

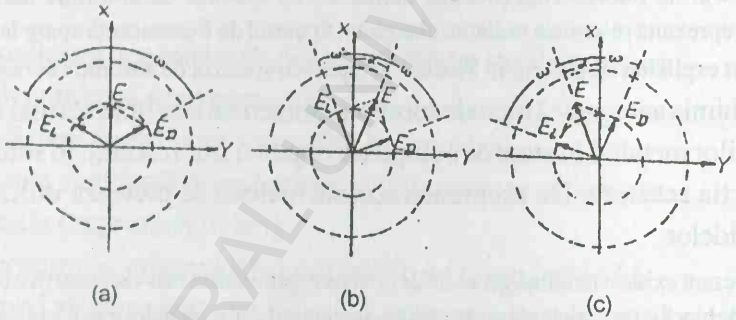


Fig. 2-19. Formarea vectorului $\vec{E}$ (rezultanta vectorilor de rotaţie $\vec{E}_D$ şi $\vec{E}_S$)

Dacă $\vec{E}_D$ se roteşte în sens orar şi $\vec{E}_S$ în sens antiorar, cu aceeaşi viteză, cei doi vectori determină unghiuri egale ($\omega = \omega'$) şi rezultanta $\vec{E}$ exprimă mişcarea unei unde plan polarizate de-a lungul direcţiei de vibraţie X (Crabbé, 1965; Sarkar şi Yang, 1987). Dacă undele asociate vectorilor $\vec{E}_D$ şi $\vec{E}_S$ se rotesc cu viteze diferite, unghiurile diferă ($\omega \neq \omega'$).

In acest caz unda plan polarizată asociată vectorului E emerge din proba optic activă rotindu-se cu unghi α faţă de directia X. Mărimile caracteristice diferă în funcţie de natura substanţei. Astfel, la substanţele:

- optic inactive: $\omega = \omega'$ şi $\alpha = 0$
- optic active: $\omega \neq \omega'$ şi $\alpha \neq 0$

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

iar în cadrul acestora, se disting substanţe:

- dextogire: $\omega > \omega'$ şi $\alpha > 0$
- senestrogire: $\omega < \omega'$ şi $\alpha < 0$

In cazul substanţelor dextro - şi senestrogire activitatea optică, recte unghiul de rotatie α, este consecinţa birefringenţei. Aceasta se explică prin existenţa unor indici de refracţie (n) diferiţi pentru razele circular polarizate la dreapta (n_D) şi la stânga (n_S) în cazul luminii incidente cu lungime de undă (λ). Astfel, rotaţia a (exprimată în radiani) este dată de relaţia:

$$\alpha = \pi (n_S - n_D)\lambda$$

Activitatea optică a unor substanţe se defineşte cu ajutorul noţiunii de **rotaţie specifică** [α] la o anumită lungime de undă λ. Determinarea acesteia se face cu ajutorul expresiei:

$$[\alpha]_\lambda = 100 / l \,.\, C$$

în care: C - concentraţia (g/100 ml)

λ - lungimea cuvei polarimetrului (dm)

De asemenea, în exprimarea activităţii optice se mai utilizează **rotaţia molară** (ϕ) exprimată prin:

$$[\phi] = [\alpha] \,.\, Gm/100$$

în care: Gm - greutatea moleculară a substanţei optic active.

Formalismul matematic caracteristic acestor metode, deşi nu complicat, este mai puţin cunoscut datorită aplicării limitate a acestor metode de mare acurateţe. In investigaţii se mai utilizează noţiunile de elipticitate specifică [Ψ] şi elipticitate molară (θ) discutate mai jos.

Elipticitatea specifică [Ψ] este dată de relaţia:

$$[\Psi] = \pi (\varepsilon_S - \varepsilon_D)/\lambda$$

în care: ε_S, ε_D - coeficienţii de absorbţie dicroică (senestro - dextrogiră).

Din valorile prezentate se mai poate afla şi valoarea elipticităţii molare [q] dată de expresia:

BCU IASI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

$$[\theta] = 0{,}01[\Psi] \cdot M$$

în care: M - concentraţia molară a substanţei

In exprimarea datelor analitice experimentale se utilizează efectul Cotton. In acest scop se procedează la evaluarea efectului Cotton şi modificărilor acestuia în înregistrările spectrale. Acest efect descoperit în 1896 de A. Cotton (citat de Crabbé, 1965) relevă faptul că un compus optic activ prezintă într-o anumită regiune spectrală, un comportament anormal al puterii de rotaţie. Astfel, informaţia de bază care poate fi dedusă din curbele de DC şi DOR este obţinută cel mai facil în imediata vecinătate a regiunii spectrale a absorbţiei maxime.

B. Aplicaţii

In cadrul biologiei moleculare investigaţiile bazate pe metodele chiroptice discutate - dicroismul circular (DC) şi dispersia optică rotatorie (DOR) - au adus importante contribuţii la înţelegerea modi-ficării structurilor sterice ale edificiilor moleculare cu profunde implicaţii în dena-turarea relaţiei structură chimică - activitate biologică. (Sarkar şi Yang 1967; Gârban et al. 1981).

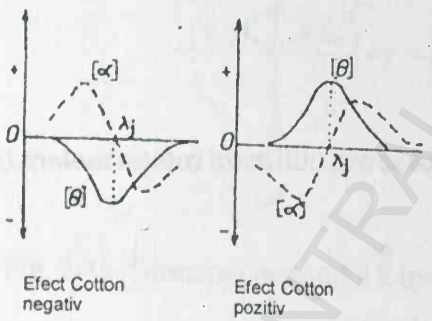


Fig. 2-20. Efectul Cotton corespunzător benzilor de absorbţie la λ_j

Inregistrările cu scop analitic, denumite în mod curent "spectre" se obţin cu ajutorul unor aparate de construcţie specială - **spectropolarimetrele**. Modificările sesizate grafic exprimă de fapt absorbţia inegală a componentelor circular polarizate la traversarea mediului. In spectre se poate reda elipticitatea molară [θ] sau rotaţia specifică [α] în funcţie de lungimea de undă (Balasubramanian şi Kumar, 1976) - fig. 2-20. Se remarcă faptul că în această figură se redau efectele Cotton negativ şi pozitiv ca funcţii (f_1, f_2) de lungime de undă (λ), pentru:

- un parametru al DC:

$$[\theta] = f_1 \cdot (\lambda)$$

- un parametru al DOR:

$$[\alpha] = f_2 \cdot (\lambda)$$

In cazul efectului Cotton negativ elipticitatea molară [θ] este minimă iar rotaţia specifică [α] scade cu lungimea de undă.

Situaţia se prezintă invers în cazul efectului Cotton pozitiv. Inflexiunea grafică a

valorii [α], recte anularea acesteia, se produce la lungimea de undă λ_j corespunzător efectelor Cotton limită (minim - maxim). In investigațiile curente, prin metodele DC și DOR, se lucrează pe un domeniu al lungimilor de undă (λ) de la 250-700 nm. Efectele Cotton sunt dependente de condițiile de investigare, spre exemplu temperatură, pH-ul mediului etc. (Yang și Samejima, 1969).

Cu ajutorul DC și DOR au fost investigați diverși bioconstituenți optic activi. Activitatea optică este conditionată de prezența atomilor de carbon asimetrici (C*) la compușii mai simpli sau la configurațiile structurale ale macromoleculelor (e.g.: structurile terțiare, cuaternare ale protidelor). Intre domeniile de interes major studiate cu ajutorul dicroismului circular se menționează acizii nucleici. Cu ajutorul DC s-au studiat modificările conformationale B - DNA sub acțiunea metalelor și formarea altor genuri de DNA, cum ar fi C - DNA, A - DNA (Gârban et al., 1982).

2.1.3.7. Metode electroforetice

Metodele electroforetice aparțin grupului de metode fizico-chimice din domeniul electrochimiei. In biochimie și biologia moleculară este utilizată în scop analitic și/sau preparativ. Metoda se bazează pe migrarea particulelor încărcate electric într-un mediu lichid sau solid supus acțiunii unui câmp electric.

A. Considerații teoretice

În electroforeza aplicată la probele biologice (e.g.: polipeptide, acizi nucleici ș.a.) se urmărește deplasarea particulelor încărcate electric datorită formării dublului strat electric la interfața particulă-mediu (e.g.: polipeptida - soluție apoasă). Aflate sub acțiunea câmpului electric, datorită diferenței de potențial, particulele se deplasează spre anod sau catod sub acțiunea unei forțe F dată de relația:

$$F = e \times E$$

în care: e - sarcina electrică a particulei

E - intensitatea câmpului electric

Deplasarea particulei este limitată de o forță de frecare F', a cărei mărime este dată de expresia:

$$F' = 6\pi \cdot r \cdot \eta \cdot v$$

în care: r - viteza particulei (6π - constantă în cazul particulelor sferice)

h - vâscozitatea mediului

v - viteza de migrare a particulei

In cazul egalizării celor două forțe se poate scrie:

$$e \cdot E = 6\pi \cdot r \cdot \eta \cdot v$$

expresie din care se determină viteza particulei în migrarea electroforetică:

$$v = e \cdot E/6\pi \cdot r \cdot \eta \cdot$$

Problema deplasării particulelor în electroforeză se exemplifică pentru polipeptide. Sarcina electrică a particulelor - respectiv a polipeptidelor (prezentate schematic) în exemplul nostru - este dependentă şi de pH - ul mediului în care se produce electroforeza. Astfel:

- în mediu acid, polipeptidele (prin R1, R2,....., Rn s-au reprezentat catenele laterale ale aminoacizilor constituenți) se încarcă pozitiv datorită grupelor aminice şi vor migra spre catod (cataforeză):

$$\overset{(+)}{H_3N}\text{-}\underset{R_1}{CH}\text{-}CO\text{-}NH\text{-}\underset{R_2}{CH}\text{-}CO\text{-} \ldots \text{-}NH\text{-}\underset{R_n}{CH}\text{-}COOH \quad \text{la } pH < 7$$

- în mediu cu pH corespunzător punctului izoelectric (notat prin pHi) specific fiecărei polipeptide, migrarea este nulă:

$$H_2N\text{-}\underset{R_1}{CH}\text{-}CO\text{-}NH\text{-}\underset{R_2}{CH}\text{-}CO\text{-} \ldots \text{-}NH\text{-}\underset{R_n}{CH}\text{-}COOH \quad \text{la } pH = pH_i$$

- în mediu bazic polipeptidele se încarcă negativ prin disocierea grupării carboxil. Migrarea se va produce spre anod (anaforeză):

$$H_2N\text{-}\underset{R_1}{CH}\text{-}CO\text{-}NH\text{-}\underset{R_2}{CH}\text{-}CO\text{-} \ldots \text{-}NH\text{-}\underset{R_n}{CH}\text{-}COO\text{-} \quad \text{la } pH > 7$$

In general, în investigațiile electroforetice se prepară soluții tampon (tehnicile de lucru având caracter rețetar), spre a evita apropierea pH_i când procesul de migrare devine mai lent (la limită, aşa cum s-a arătat acesta este nul).

B. Aplicații

Utilizarea metodelor electroforetice în biochimie şi biologie moleculară are în vedere faptul că se pot utiliza suporturi (medii):

- omogene (suportul fiind o coloană de lichid)
- heterogene (suporturi solide: hârtie de filtru, geluri de agar, poliacrilamida etc.).

O referire aparte se face cu privire la faptul că în domeniul biologiei moleculare au fost dezvoltate diverse studii asupra acizilor nucleici, care se efectuează prin metode electroforetice. In acest sens se menționează electroforeza în gel de agaroză şi electroforeza în gel de poliacrilamidă.

Pentru problemele privind studiul imunologiei, imunogeneticii şi mai recent al imunomodulării prin mijloacele biologiei moleculare se utilizează în mod curent imunoelectoforeza.

Unele metode electroforetice sunt dezvoltate în protocoale de laborator. In detaliu aceste metode sunt expuse în literatura de specialitate din domeniul electrochimiei.

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

O problematică specială a investigațiilor analitice este abordată cu ajutorul *metodelor specifice biologiei moleculare* (v. Cap. 4). Dintre aceste metode se menționează:secvențializarea macromoleculelor de acizi nucleici; hibridizarea catenelor acestora; detectarea prin sonde moleculare; amplificarea prin reacția în lanț a polimerazei; evaluarea polimorfismului lungimii fragmentului de restricție. La baza aplicării acestor metode se află *metodele biochimice*. O parte din acestea au fost expuse în prezentul subcapitol.

2.1.4. POSIBILITĂTI DE INVESTIGARE INTEGRATĂ

In biologia celulară și moleculară se urmărește studiul aspectelor ultra- structurale utilizându-se procedee ale microscopiei electronice, precum și decelarea bioconstituenților moleculari și atomici prin metode biochimice de acuratețe.

Remarcabil este faptul că aprofundarea investigațiilor pornind de la formațiunile ultrastructurale și terminându-se cu bioconstituenții materiei vii implică o continuă integrare metodologică. Astfel, spre exemplu, limitele explorării (domeniu, dimensiuni) pot fi extinse metodologic (fig.2-21). Procedeele microscopice și metodele biochimice pot să interfere în explorarea "cadrului" celular și molecular deplasând limitele dimensionale și implicit domeniul cunoașterii.

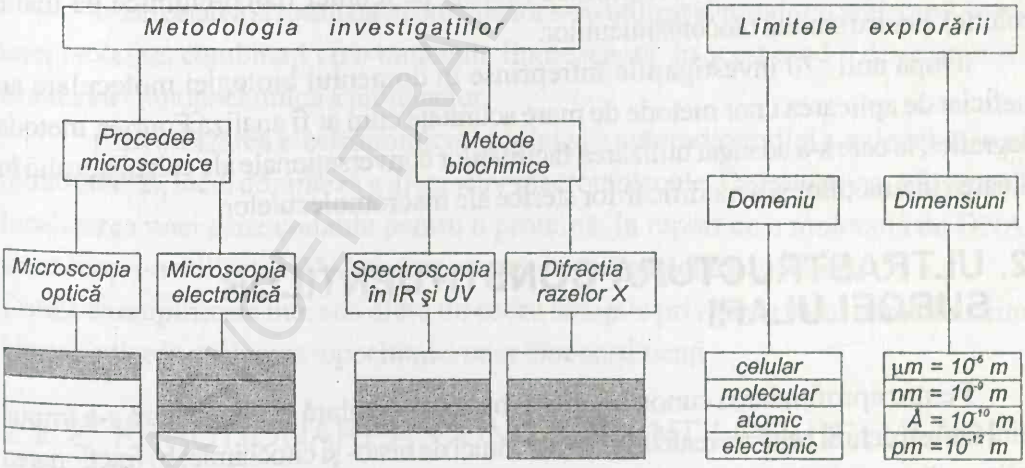


Fig. 2-21. Metodologia investigațiilor și limitele explorării în biologia moleculară

Pentru elucidarea aspectelor aplicative ale procedeelor microscopice se reiterează ideea că microscoapele folosite în prezent pot atinge rezoluții care merg pâna la 1,2 - 2,0 A.

Acestea aparent, ar putea asigura şi vizualizarea structurilor din biomolecule vizând resturile de aminoacizi dintr-o catenă polipeptidică (e.g.: dimensiunile aminoacizilor fiind între 5,1 Å la glicol şi 175,5 Å la triptofan). In realitate problema este mai complexă datorită faptului că rezoluţia de 1,2-2,0 Å este atinsă doar în reţelele cristaline ale compuşilor studiaţi.

Pentru studiul biomoleculelor protidice (polipeptide, acizi nucleici) şi glucidice se utilizează metode fizico-chimice care se pretează cercetării biochimice (numite din acest considerent şi "metode biochimice"). Intre acestea se menţionează metodele spectroscopice: spectroscopia în IR, în UV şi difracţia cu raze X.

In ultimii ani lucrându-se pe secţiuni efectuate cu ultramicrotonul (secţiuni ultrafine) şi folosind metodologii conjugate, cum ar fi: microscopia electronică, marcarea izotopică şi autoradiografia, s-au putut urmări şi modificările consecutive secvenţializării macromoleculelor de acid deoxiribonucleic. Astfel de cercetări au putut fi efectuate "in vitro" şi "in vivo".

De asemenea, a putut fi studiată formarea de homo- şi heteroduplexuri prin procese de hibridizare, deci a unor molecule hibride de tipul DNA-DNA sau DNA-RNA. Astfel de investigaţii - denumite uneori de "taxonomie moleculară" - au permis evaluarea pe baza proceselor de hibridizare, a posibilei înrudiri a organismelor.

Investigaţiile care interesează biologia moleculară şi care vizează detaliile subcelulare, moleculare şi chiar atomice, implică fracţionarea celulară şi ultracentrifugarea. Aceste etape sunt urmate de aplicarea procedeelor electronomicroscopiei pentru studiul ultrastructurii şi a metodelor biochimice (bazate pe tehnici fizico-chimice de înaltă rezolutie), pentru studiul bioconstituenţilor.

După anii '70 investigaţiile întreprinse în domeniul biologiei moleculare au beneficiat de aplicarea unor metode de mare acurateţe cum ar fi analiza Fourier, metoda holografiei, la care s-a adaugat utilizarea facilităţilor conversaţionale ale calculatorului în evaluarea interacţiilor şi a modificărilor sterice ale macromoleculelor.

2.2. ULTRASTRUCTURA CONSTITUENTILOR SUBCELULARI

Pentru aprofundarea cunoştintelor în biologia celulară şi moleculară s-a impus studiul ultrastructurii celulare realizat prin: a) tehnici de histo- şi citochimie; b) fractionarea constituenţilor celulari.

2.2.1. ROLUL TEHNICILOR CITO- SI HISTOCHIMICE

Prezentate într-un cadru sinoptic, se poate afirma că tehnicile cito- şi histochimice se bazează pe utilizarea unor substante care se colorează sau îşi schimbă culoarea în

contact cu anumiţi compuşi prezenţi în celule. In acest mod devine posibilă localizarea diverselor biomolecule în celule şi tesuturi.

Astfel de tehnici, spre exemplu, au avut un rol important pentru decelarea şi localizarea în celule a acizilor nucleici: acidul deoxiribonucleic şi acidul ribonucleic. S-a constatat că DNA este localizat în nucleu şi citoplasmă. Localizarea nucleară se realizează la nivelul cromatinei respectiv a cromosomilor. In citoplasmă localizarea se realizează în mitocondrii - DNA mitocondrial (numit uneori şi DNA extracromosomial).

Referitor la RNA s-a decelat existenţa acestuia sub forma a trei tipuri: mesager (mRNA), de transfer (tRNA) şi ribosomal (rRNA). De asemenea, s-a constatat că RNA este localizat în nucleu şi citoplasmă. In nucleu se află cantităţi mai reduse, prezent fiind predilect mRNA. In citoplasmă se află rRNA şi tRNA distribuiţi astfel: rRNA în ribosomi; rRNA şi tRNA în mitocondrii.

Pentru localizarea acizilor nucleici şi a proteinelor în celulă - domeniu aparţinând topochimiei celulare - se utilizează diverse reacţii specifice, e.g.: reacţiile Feulgen, Brachet,Casperson. Reacţia Feulgen, bazată pe recolorarea fucsinei decolorată cu bisulfit, a permis localizarea DNA. Reacţia Brachet a făcut posibilă localizarea RNA prin utilizarea combinată a unei enzime şi a unui colorant. Reacţia Casperson, efectuată cu ajutorul radiaţiilor ultraviolete, se pretează pentru localizarea proteinelor în celulă.

In cercetarea şi localizarea proteinelor s-au utilizat şi reacţia cu anticorpii specifici unei proteine, combinaţi cu o moleculă fluorescentă. In acest mod a devenit posibilă evaluarea citotopochimică a proteinelor.

Prin utilizarea electronomicroscopiei şi a autoradiografiei s-a decelat, la nivel ultratructural, locul de sinteză a diverselor macromolecule. De asemenea, a fost posibilă localizarea unei gene codante pentru o proteină, în raport cu o moleculă de DNA. In acest scop s-a utilizat şi RNA mesager marcat, codant pentru proteine.
Datele exemplificate mai sus oferă un cadru sinoptic privitor la rolul tehnicilor cito- şi histochimice în evaluarea topochimiei unor bioconstituenţi.

2.2.2. FRACTIONAREA CONSTITUENTILOR CELULARI

Prin fracţionare se pot obţine particulele constituente ale celulei, într-o stare de puritate suficient de avansată, pentru a permite studiul morfologic şi biochimic al acestora. De asemenea este posibilă evidenţierea funcţiilor acestora in vitro.

Diferitele particule se caracterizează în principal - prin dimensiuni şi densitate. Aceste caracteristici definesc fiecare tip de particulă şi, într-un cadru mai larg, ultrastructura celulară.

Fracționarea se realizeaza prin centrifugare. Intr-o etapă preliminară țesutul este broiat într-un omogenizator Potter. Pentru aceasta, țesutul se pune în suspensie, într-o soluție de sucroză (zaharoză). Omogenatul astfel obținut este separat prin centrifugare diferențială. Cu referire la această tehnică se pot discuta principiul centrifugării şi diferitele tipuri de centrifugare.

2.2.2.1. Principiul centrifugării

Viteza căderii corpurilor este dependentă de greutatea, recte de densitatea acestora, în raport cu mediul. Dacă corpurile sunt foarte uşoare, cum ar fi de exemplu particulele celulare, viteza de cădere a acestora este neglijabilă. In scopul creşterii vitezei, şi a separării particulelor, se utilizează centrifugele. Acestea sunt aparate de construcție specială, dotate cu un motor care asigură o mişcare rapidă în jurul unei axe a recipientelor (tuburilor sau eprubetelor) destinate centrifugării unei soluții sau a unei suspensii.

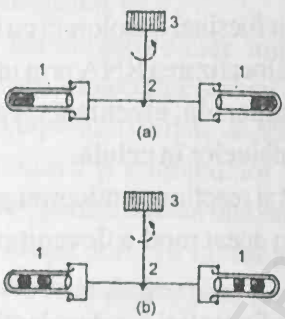


Fig. 2-22. Metode de centrifugare. (a) simplă; (b) zonală 1. Eprubete; 2.Sisteme de suspensie a eprubetelor; 3. Motor pentru rotație

In funcție de condițiile de separare ale particulelor se disting: *centrifugarea simplă* - în care particulele grele se depun mai rapid la baza eprubetei; *centrifugarea de zonă* - în care particulele aflate în suspenie se separă, în funcție de constantele de sedimentare, pe anumite porțiuni ale tubului de centrifugă. Aspectele caracteristice sunt redate în fig. 2-22. Separarea particulelor sau a moleculelor aflate în suspensie se face prin centrifugare în recipiente (tuburi sau eprubete) izolându-se sedimentul depus la bază şi supernatantul rămas în partea superioară. Forța centrifugă G, la care sunt supuse particulele din suspensie poate fi exprimată prin relația:

$$G = \omega_2 . r (N2\pi/60)$$

în care: ω - viteza unghiulară
(exprimată în radiani/secundă);
N - exprimat şi prin numărul de rotații pe minut
(rpm) - multiplicat prin $2\pi/60$
r - distanța de la particula centrifugată la axa centrifugii.

BCU IAŞI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

In procesele de separare prin centrifugare se are în vedere valoarea acceleraţiei centrifuge exprimată, în general, prin acceleraţia gravitaţională terestră care are valoarea 980 cm/s^2. Astfel spre exemplu pentru cazul unei acceleraţii radiale de 49 x 107 cm/s^2 îi corespund echivalentul de 50.000 g (unde g - acceleraţia gravitaţională)

Există aparate în care se obţin valori ale forţei centrifuge G de 100.000 g şi chiar mai mult. Astfel de aparate se numesc ultracentrifuge. Rotorul acestora, spre a evita încălzirea, este dispus într-o cameră în care se face vid şi care este supusă unei refrigerări energice şi continue.

In Biologia moleculară, pentru caracterizarea comportamentului unei particule se poate uzita de **constanta de sedimentare** (S_{20w}). Aceasta este dată de expresia:

$$S_{20w} = dr/dt \,.\, 1/G$$

şi are valori generale cuprinse între $1 \,.\, 10^{-13}$ - $100 \,.\, 10^{-13}$ sec. Valorile fiind extrem de mici s-a convenit a se exprima constanta de sedimentare în unităţi Svedberg (S), mărimea acesteia fiind $1S = 10^{-13}$ secunde. In exprimarea curentă a constantei de sedimentare S se are în vedere influenţa temperaturii şi a viscozităţii mediului, de asemeni se face raportarea la 20°C în mediu apos (water). Din aceste considerente pentru constanta de sedimentare se utilizează curent notaţia S_{20W}.

Constanta de sedimentare (S_s) se măsoară la 20°C şi în mediu apos (din acest motiv se păstrează subscriptele). Valoarea acesteia poate fi exprimată şi în funcţie de viteză şi de acceleraţia centrifugală:

$$S_{20W} = v/c$$

în care v - viteza

c - acceleraţia centrifugală

Discutarea problemei sedimentării porneşte de la propreităţile cinetico-moleculare ale sistemelor coloidale. In condiţiile sedimentării (obişnuite) se produce căderea particulelor coloidale în câmpul gravitaţional. In cazul sedimentării centrifugale se are în vedere acceleraţia centifugală.

Fiecare particulă supusă sedimentării este supusă la două forţe care acţionează în sens opus: forţa gravitaţională în speţă forţa centrifugală F_c şi rezistenţa mediului, evaluată ca forţă de fricţiune F_f, deci $F_c = F_f$

Particula suspendată cu densitatea d_1 aflată într-un mediu cu densitatea d_2 este supusă forţei centrifuge F_c. Viteza de mişcare într-un mediu staţionar este proporţională cu acceleraţia gravitaţională g - avându-se în vedere faptul că într-un câmp centrifugal valoarea g poate fi exprimată prin acceleraţia centrifugală c. In cazul unei particule sferice valoarea forţei F_c este:

$$Fc = m \,.\, g = 4 \,/\, 3\, \pi r^3 (d_1 - d_2)\, c$$

din care masa particulei coloidale heterogene (m) este:

$$m = 4\,/3\ \pi r^3 (d_1 - d_2)$$

în care: r - viteza particulei

In cursul mişcării sale intervine fricţiunea dintre particula sferică şi mediu. Pentru aceasta s-a dedus ecuaţia Stokes care descrie mişcarea particulelor sferice în condiţiile unui fluid ideal (ecuaţia a fost preluată din domeniul hidrodinamicii). La acceleerarea rezistenţei mediului, reprezentată prin forţa de fricţiune Ff creşte. Valoarea acesteia este:

$$F_f = 6\ \pi r\, \eta\, v$$

în care: 6π - este un coeficient dependent de forma sferică

r - raza particulei (sferice)

η - vâscozitatea

Din egalizarea forţelor opuse, amintite mai sus, se obţine:

$$\frac{4}{3}\pi r^3(d_1 - d_2)c = 6\pi r\eta v$$

de unde se obţine:

$$v = 2cr^2\left(\frac{d_1 - d_2}{9\eta}\right)$$

In final din relaţia care exprimă care exprimă constanta de sedimentare rezultă:

$$S_{20w} = \frac{v}{c} = \frac{4/3\pi r^3(d_1 - d_2)}{9\eta r}$$

Valoarea constantei de sedimentare S_{20w} exprimată în unităţi S este şi un indiciu al mărimii moleculei. Astfel, spre exemplu la cele trei tipuri de RNA ribosomal de la Escherichia coli s-au aflat valori de 5 S, 16 S şi 23 S. Moleculele respective au lungimi diferite, incluzând 120, 1.600, respectiv 3.200 nucleotide.

Referitor la valoarea Svedberg s-a constatat că aceasta este dependentă de masa moleculei, de forma şi rigiditatea particulei, fără însă a fi proporţională cu masa moleculară. In cazul particulelor complexe, valoarea S a constantei de sedimentare s nu este, în general, egală cu suma constantelor de sedimentare ale constituenţilor.

2.2.2.2. Tipuri de centrifugare

In definirea şi caracterizarea tipurilor de centrifugare se are în vedere, aşa cum s-a arătat mai sus, modul de separare al particulelor. Separarea este dependetă de constantele de sedimentare şi mediul de suspensie.

2.2.2.2.1. Centrifugarea simplă

Centrifugarea simplă se caracterizează prin faptul că omogenatul se află în suspensie într-un mediu izotonic (e.g.: 0,25 M sucroză) la rece. Acesta este centrifugat mai mult timp la rece. Operatiunea se desfăşoară în mai multe etape succesive (fig. 2-23).

Astfel, prin cetrifugare la 800 g timp de 10 minute, se obţine supernatanatul şi sedimentul care conţine nucleele (reprezentând constituenţii celulari cei mai grei) şi fragmente de membrane. Metodologiile preparative pentru nuclee pun probleme dificile în situaţia în care se urmăreşte evitarea contaminării cu reziduri citoplasmatice (fapt important pentru studiul acizilor nucleici).

Supernatantul rezultat în urma centrifugării, corespunzând structural citoplasmei, este supus unei noi etape de centrifugare la 12.000 g cu durata de 20 min. In sedimentul rezultat se află, în principal, mitocondrii şi lizosomi.

In continuare supernatantul (postmitocondrial) este centrifugat la 50.000 g în timp de 2 ore. In sediment apar microsomii şi unele resturi membranare. O următoare etapă

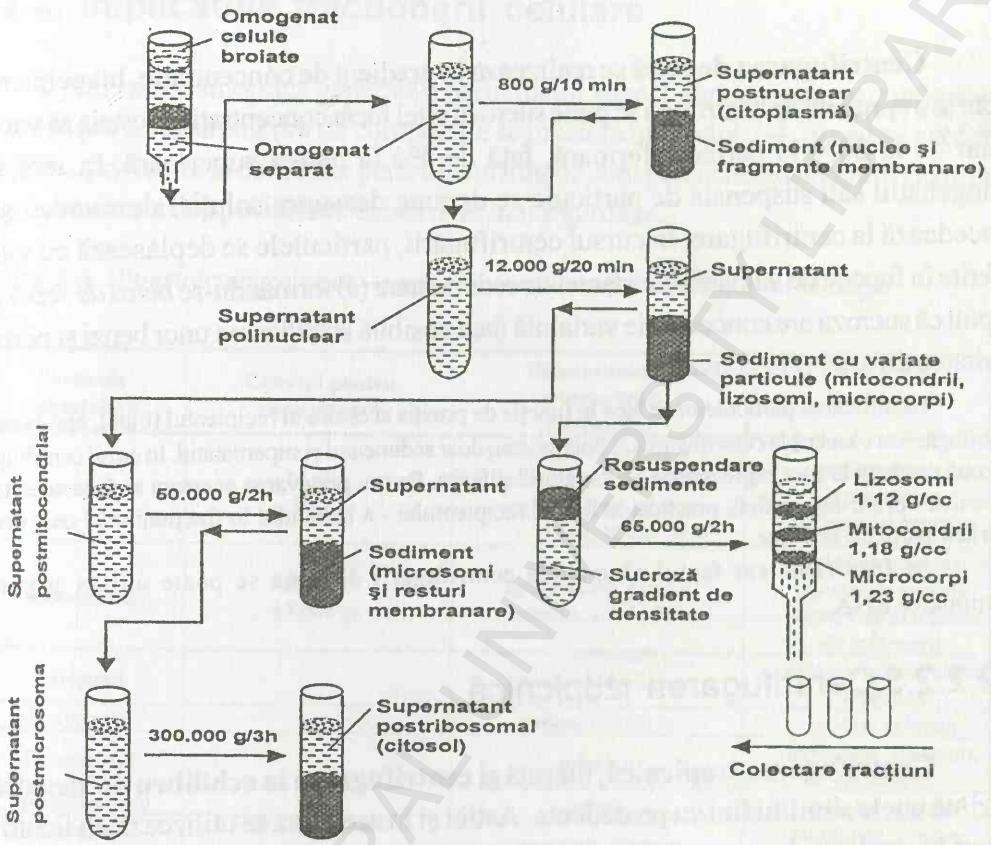


Fig.2-23. Fracţionarea particulelor subcelulare (crochiu general al etapelor preparative)

este reprezentată de centrifugarea la 300.000 g în timp de 3 ore a supernatantului postmicrosomial cu obţinerea (în sediment) a ribosomilor liberi. Supernatantul final (postribosomal) reprezintă citosolul - parte solubilă a celulei - care în situaţia respectiva este dizolvat în soluţie de sucroza.

O secvenţa aparte a operaţiunilor de fracţionare este reprezentată de resuspendarea sedimentului cu continut de lizosomi, mitocondrii şi microcorpi. Sedimentul adus astfel în suspensie este supus separării prin centrifugare izopicnică. Pentru aceasta, amestecul aflat într-un mediu de sucroză în gradient de densitate (între 1,12 - 1,33 g/cm^3) - este supus centrifugării la 65.000 g timp de 2 ore. In acest mod se produce o fracţionare în gradient de densitate, iar la final se poate proceda la colectarea fracţiunilor.

In cazul fracţionării particulelor subcelulare, o singură serie de centrifugări nu permite obţinerea particulelor pure. Investigaţiile analitice implică utilizarea diferitelor tipuri de centrifugare, asigurând astfel o prelucrare mai avansată în fazele preparative.

2.2.2.2.2. Centrifugarea de zonă

Centrifugarea de zonă se realizează în gradient de concentraţie. In recipientul, tubul sau eprubeta de centrifugă se pune sucroză atfel încât concentraţia acesteia să varieze liniar de la 20% la partea inferioară, faţă de 5% la partea superioară. In recipient omogenatul sau suspensia de particule se depune deasupra soluţiei de sucroză şi se procedează la centrifugare. In cursul centrifugării, particulele se deplasează cu viteze diferite în funcţie de valoarea constantei de sedimentare (s) formându-se *benzi de separare*. Faptul că sucroza are concentraţie variabilă face posibilă stabilizarea unor benzi şi permite limitarea difuziei prin convecţie.

Identificarea particulelor se face în funcţie de poziţia acestora în recipientul (tubul, eprubeta) de centrifugă. Am văzut că la centrifugarea simplă existau doar sedimentul şi supernatatul. In cazul centrifugării de zonă particulele sunt reprezentate pe "straturi" diferite. Pentru prelevarea acestora se face colectarea succesivă - printr-un orificiu practicat la fundul recipientului - a lichidului în fracţiuni mici care conţin diferitele particule separate.

Se face remarcat faptul că metoda centrifugării de zonă se poate utiliza şi pentru fracţionarea RNA.

2.2.2.2.3.Centrifugarea izopicnică

Centrifugarea izopicnică, numită şi **centrifugarea la echilibru de densitate** prezintă unele similitudini cu precedenta. Astfel şi în acest caz se utilizează un lichid de suport în gradient de concentraţie. Lichidul de separat însă trebuie să aibă o densitate foarte mare. In acest scop, în mod curent, se utilizează: apă grea, sucroza (la concentratie ridicată), clorura de cesiu, ş.a.

Fracţionarea particulelor în cazul cetrifugării izopicnice, se face în funcţie de densitate şi nu în funcţie de constanta de sedimentare. Astfel se realizează o centrifugare de echilibru în cursul căreia particulele se deplasează până când ajung la un nivel al lichidului cu aceaşi densitate ca ele însele. Acest tip de centrifugare se utilizează pentru separarea mitocondriilor şi lizosomilor.

In cazul utilizării unui lichid de suport care conţine clorura de cesiu (CsCl) se are în vedere greutatea atomică mare a Cs (113). Lichidul de suport, în acest caz, este o soluţie de CsCl cu concentraţia 8M, care are o densitate foarte mare şi în care se pune în suspensie amestecul care urmează a fi fracţionat. In cursul centrifugării, ionii de Cs^+ tind să se sedimenteze, realizând astfel un gradient de concentraţie a cărui densitate este cuprinsă între 1,55-1,80 g/cm^3. In această situaţie particulele sau moleculele supuse fracţionării, se regrupează în benzi transversale în funcţie de densitatea aparentă.

Metoda cetrifugării izopicnice se poate utiliza în fracţionarea şi caracterizarea DNA. De asemenea, metoda se pretează separării DNA în care se află incorporat un izotop greu faţă de DNA normal (iniţial) nemarcat.

2.2.2.3. Implicatiile fractionării celulare

O prezentare sinoptică generală a particulelor subcelulare cu redarea condițiilor de obținere și a caracteristicilor de compoziție se prezintă în tabelul 2-4. In cadrul acestui tabel, datele privitoare la condițiile pentru centrifugare sunt precizate doar pentru cazurile în care în literatura de specialitate există date mai riguroase.

Tabel 2-4. Ultrastructura celulară – particule, constituenți subcelulari, rol biologic

Particule subcelulare	Condiții pentru centrifugare	Bioconstituenți caracteristici particulari	Rol biologic
Nucleul	10 min. 800 g.	DNA, RNA (nuceolar), proteinebazice și acide, enzime pentru sinteza DNA, RNA	conservarea și transmiterea informației genetice
Mitocondrii	20 min. 12.000 gr.	lipoproteine, enzime oxidative, DNA, RNA	oxidarea celulară, transfer de energie, conservare și transfer de informație
Lizosomi		enzime hidrolitice	digestia intracelulară, hidroliza
Peroxizomi		enzime oxidative	oxidare celulară
Microtubuli		tubulina	mobilitate, transport, citoschelet
Microfilamente		actina	mișcări celulare
Filamente intermediare		vimentina, desmina	mobilitate, creștere, morfogeneză
Aparat Golgi		glicoproteine	sinteza de glicani, exportul de proteine
Reticul Endoplasmatic	2 ore 50.000 g.	lipoproteine	transport de proteine, sinteza de lipide și de glicani
Ribosomi	3 ore 300.000 g.	ribonucleoproteine, proteine	biosinteza de proteine
Citosol	3 ore 300.000 g.	enzime diverse	transformări enzimatic glicoliza, ș. a.
Membrana		lipide simple, fosfolipide	tranzit specific, proces de reglare

În general, este cunoscut faptul că în studiul fracțiunilor subcelulare și al bioconstituenților se impune, într-o primă etapă, izolarea și purificarea acestora. După aceea, într-o etapă secundă, se efectuează analize diverse. Metodologia în contextul succesiunii operațiilor de izolare, purificare și analiză - menționate mai sus - presupune o distincție de *etapă* și de *procedură*.

BCU IASI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Cu privire la bioconstituenţi se remarcă şi unele particularităţi ale relaţiei compoziţie - rol biologic. Dezvoltarea şi aprofundarea acestor informaţii au condus la definirea noţiunilor privitoare la relaţia structură chimică - activitate biologică.
In mod curent pentru studiul bioconstituenţilor se pot uzita metode preparative şi analitice ale căror particularităţi sunt prezentate în continuare.

Termenul de "*metode preparative*" implică necesitatea parcurgerii unor etape de izolare şi purificare în cursul cărora particulele subcelulare şi biomoleculele (e.g.: proteinele) sunt supuse fracţionării diferenţiale. In acest mod se procedează la îndepărtarea altor particule sau biomolecule aflate în mediu şi considerate contaminate (Karp, 1984). In multe cazuri diversele metode preparative utilizate realizează concomitent atât procese de izolare cât şi de purificare a particulelor subcelulare sau moleculare. In general procesele de purificare se parcurg pas cu pas, urmărind eliminarea contaminaţilor din preparat astfel ca gradul de purificare să fie cât mai avansat. In acest scop se măsoară activitatea specifică (raportarea făcându-se la compusul chimic pur). Spre exemplu, dacă se vizează o biomoleculă de natură proteică şi aceasta este o enzimă, se procedează la măsurarea activităţii catalitice a preparatului.

Termenul de "*metode analitice*" presupune utilizarea unor procedee care permit - în cea mai largă accepţie - descompunerea întregului în părţi şi examinarea acestuia. Pentru determinări curente se utilizează diferite metode, predilect acelea bazate pe tehnici microanalitice. Intre acestea se pot menţiona: spectrofotometria (în diversele sale variante), difracţia cu raze X ş.a.

Un aspect aparte al implicaţiilor fracţionării particulelor subcelulare sau biomoleculare şi aplicării metodelor preparative şi analitice rezidă în faptul că acestea prezintă o anumită coerenţă procedurală. Spre exemplu, dacă se urmăreşte determinarea diferitelor tipuri de macromolecule prezente în ribosomii bacterieni, primul pas este de natură preparativă, constând în izolarea şi purificarea probelor de ribosomi obtinute, după care se procedează la solubilizarea componenţilor. In continuare, pasul secund, constă în separarea şi determinarea analitică a diverselor biomacromolecule prezente, în scopul obţinerii de informaţii asupra structurii chimice şi activităţii biologice a acestora.

BCU IAŞI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

3. ACIZII NUCLEICI: STRUCTURA CHIMICĂ - ACTIVITATE BIOLOGICĂ

Studiul structurii şi funcţiei acizilor nucleici prezintă o importanţă majoră pentru ştiinţele biologice moderne în general şi pentru biologia moleculară în special. In acest context se menţionează aportul esenţial adus în elucidarea unor probleme referitoare la ereditate, evoluţie (ontogeneză şi filogeneză), erori metabolice înnăscute (tulburări ereditare), studiul cancerului (oncogeneză, oncoterapie), tehnologia DNA recombinant cu implicaţiile sociale, morale şi economice ale acesteia (Bryce, 1985; Watson et al., 1987).

Acizii nucleici sunt constituenţi ubicvitari ai materiei vii. In natură, macromoleculele de acizi nucleici se află libere sau sub formă de nucleoproteide cu variată distribuţie topochimică în structurile celulare (i.e. procariotice, eucariotice) şi acelulare (i.e. virale). La procariote prezenţa acestor macromolecule nu este strict legată de o structură morfologică definită. La eucariote localizarea se face preponderent în nucleul celular, existând însă (cantităţi reduse) şi în citoplasma celulară şi mitocondrii (Darnell et al., 1986).

In regnul animal prezenţa acizilor nucleici a fost sesizată de F.Miescher în 1869, prin decelarea, în celulele lizate de puroi uman şi în sperma de somon, a unei substanţe cu conţinut ridicat de fosfor, numită de acesta "nucleină". Autorul considera că nucleina este suportul genetic din spermatozoizi.

Mult mai târziu, în 1889, R.Altman (citat de Geissler, 1972) izolează "nucleina" şi din regnul vegetal (drojdie) sesizând aspectul macromolecular şi denumind-o *"acid nucleic"*. Această denumire a fost, ulterior, general acreditată în biochimie şi în biologia moleculară.

3.1. CONSIDERATII GENERALE

Progresele realizate în studiul biomacromoleculelor de acizi nucleici, din regnurile vegetal şi animal, au adus noi dovezi cu privire la compoziţie şi structură. Astfel, cercetări întreprinse asupra acidului nucleic din drojdie au arătat că în compoziţia acestuia intră riboza, acidul fosforic şi nucleobazele: adenina, guanina, citozina şi uracil, compusul denumindu-se *acid zimonucleic*. Efectuându-se cercetări asupra acidului nucleic din timus, s-a constatat că are constituenţi, în parte, diferiţi. Acest acid, denumit *acid timonucleic* (izolat din timus de viţel), conţine deoxiriboa alături de acidul fosforic şi nucleobazele: adenina, guanina, citozina, timina.

Ulterior s-a constatat că acizii zimo- şi timonucleici sunt macromolecule cu compoziţie poliheteronucleotidică, prezentând două forme deosebite structural şi funcţional: **acidul ribonucleic** (ARN sau RNA) respectiv, **acidul deoxiribonucleic** (ADN sau DNA). Denumirile au în vedere componenta glucidică - pentoza), i.e.riboza (Rib) sau deoxiriboza (dRib).

Uzitarea în literatura de specialitate de limbă română a acronimelor DNA şi RNA - pentru denumirea acizilor nucleici - a fost acreditată încă din 1981 de Academia Română. In literatura de limbă franceză termenul s-a impus din deceniul şase. Cu titlu informativ se menţionează că acizii nucleici - compuşi intens studiaţi în ultimele patru decenii - poarta numirile: nucleic acids - lb. engl.; acides nucleiques - lb. fr.; Nukleinsäure - lb. germ.; nucleinîe kislotî - lb. rusă. Există însă - în literatura de specialitate - o tendinţă similară aceleia din domeniul farmacologiei, de a uzita denumiri comune internaţionale (în farmacologie în astfel de situaţii se face şi precizarea D.C.I. semnificând "Denomination Commune Internationale").

Aceste biomolecule, izolate din diverse produse biologice, sunt substanţe incolore sau slab gălbui cu aspect de pulbere. Prezintă stabilitate redusă în apă, dar în soluţii alcaline devin solubile şi formează soluţii coloidale. Din soluţiile coloidale acizii nucleici precipită în prezenţa acizilor anorganici şi organici (Chargaff şi Davidson, 1955).

Prin hidroliză în mediu slab alcalin, macromoleculele de acizi nucleici se scindează în fragmente numite oligonucleotide, iar la o hidroliză mai avansată se ajunge la mononucleotide (numite adesea direct "nucleotide"). Acestea sunt de fapt unităţile structurale ale acizilor nucleici.

In cazul unei *hidrolize moderate* (acidă, bazică sau enzimatică) procesul de descompunere al acizilor nucleici conduce iniţial la monucleotide, apoi la nucleozide şi

acid fosforic. Nucleozidele la rândul lor se pot scinda în nucleobaze (baze azotate heterociclice) şi pentoze.

Pentru precizarea naturii compuşilor de tip nucleotidic şi nucleozidic rezultaţi, uzual numele acestora este precedat de simbolul literar r - pentru riboză şi d - pentru deoxiriboză (pentozele constituente).

In cazul *hidrolizei totale*, redată schematic în fig. 3-1, acizii nucleici se descompun până la produşii finali: nucelobaze de tip purinic (adenina, guanina) şi pirimidinic (citozina, timina, uracilul), pentoze (riboza, deoxiriboza) şi acid fosforic.

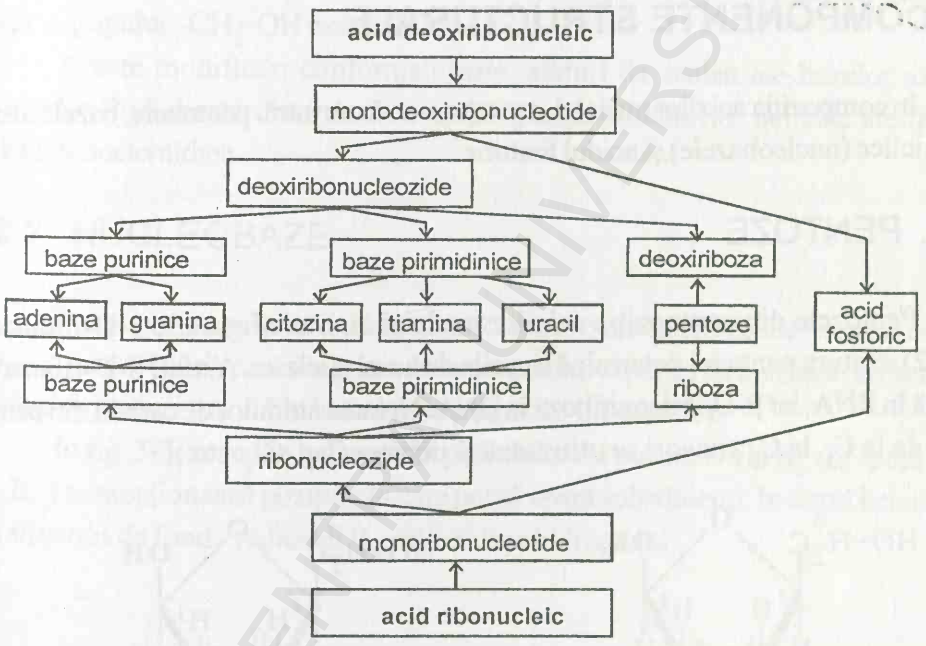


Fig. 3-1. Hidroliza totală a acizilor nucleici (schema generală)

In afara bazelor azotate menţionate, în compoziţia acizilor nucleici se mai pot întâlni, în cantităţi reduse, şi alţi derivaţi purinici (6-metiladenina, 2-metiladenina) sau pirimidinici (5-hidroxiuracilul, 5-metilcitozina, 5-hidroximetilcitozina).

Asupra naturii legăturilor dintre constituenţii acizilor nucleici au fost întreprinse numeroase studii. Intre acestea, un moment remarcabil este reprezentat de cercetările asupra ribomononucleotidelor, efectuate prin titrări electrometrice, care au arătat că în RNA se realizează o legătură fosfodiesterică între moleculele de riboză (Levene şi Simms, 1926). In această ipoteză fiecare grupare fosfat se leagă la ribozele din două ribonucleotide vicinale.

Fiecare riboză, la rândul său, este legată de una din bazele azotate.

Această formulare s-a dovedit a fi corectă pentru toţi acizii nucleici, iar prin cercetările care au urmat s-a stabilit doar tipul şi poziţiile legăturilor glicozidice din nucleozidele purinice şi pirimidinice şi a legăturilor diesterice din nucleotide.

Acizii nucleici sunt componenţi structurali ai proteinelor conjugate (i.e. heteroproteinelor) din subclasa cunoscută sub numele de nucleoproteine.

Nucleoproteinele sunt formate structural din două grupări (componente): gruparea proteică şi gruparea prostetică.

3.2. COMPONENTE STRUCTURALE

In compoziţia acizilor nucleici, aşa cum s-a văzut, intră: pentozele, bazele azotate heterociclice (nucleobazele) şi acidul fosforic.

3.2.1. PENTOZE

Pentozele din compoziţia acizilor nucleici au o configuraţie b-D-furanozică (fig. 3-2). Natura pentozei determină tipurile de acizi nucleici. Astfel, β-D-riboza este prezentă în RNA, iar β-D-2-deoxiriboza în DNA. Notarea atomilor de carbon din pentoze se face de la C_1, la C_5, (uneori se utilizează şi notarea $C\text{-}_1$,, $C\text{-}_2$, etc.).

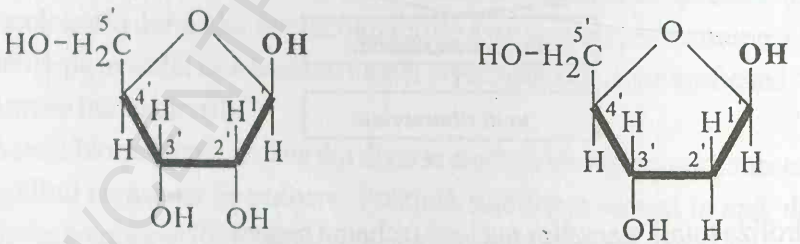


Fig. 3-2. Structura ciclică a pentozelor. (I) β-D-riboza; (II) β-D-deoxiriboza

In cadrul ciclului furanozic al pentozelor inserate în macromoleculele acizilor nucleici, se realizează stări de torsiune care determină apariţia conformaţiilor endo- şi

exo-. Rolul acestora devine evident în cadrul structurilor secundare a acidului deoxiribonucleic (Jack, 1979).

Legarea pentozelor, în cadrul nucleotidelor, se face cu bazele azotate (legătura glicozidică) la C_1, şi cu acidul fosforic (legătura fosfodiesterică) la C_3, şi C_5,. Intre pentozele vicinale se realizează o legătură fosfodiesterică de tipul C_3,-C_5,, caracteristică catenelor macromoleculare ale acizilor nucleici.

Structura ciclică a pentozelor nu este planară, ceea ce face posibilă o anumită rotaţie liberă. In urma acesteia apar modificări conformaţionale, care afectează unghiurile interne şi tranziţiile endo- şi exo- (Arnott, 1978; Jack, 1979). De asemenea, există libera rotaţie a grupului –CH_2–OH exociclic al pentozei.

Aceste modificări conformaţionale, alături de acelea ale bazelor azotate şi legăturilor fosfodiesterice, vor concura la apariţia structurilor helicale ale lanţurilor poliheteronucleotidice.

3.2.2. NUCLEOBAZE

In compoziţia acizilor nucleici există baze azotate heterociclice - numite cu termen generic "nucleobaze", care din punct de vedere chimic aparţin pirimidinei (un heterociclu diazinic) şi purinei (un dublu heterociclu pirimidin-imidazolic).

In fig. 3-3, se redau heterociclii pirimidinic şi purinic. Prin R_{i-} (în speţă R_{2-}, R_{4-}, R_{5-}, R_{6-}) se menţionează poziţiile în care pot să apară substituenţi. In cazul heterociclilor - ca structuri de fond - radicalul R_{i-} este de fapt hidrogenul.

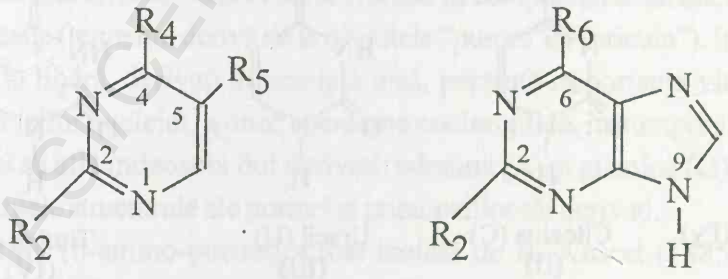


Fig. 3-3. Heterociclii prezenţi în nucleobaze: (I) Pirimidina; (II) Purina

BCU IASI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Existența heterociclilor este de mult cunoscută datorită numeroşilor derivați şi a largei lor răspândiri. Astfel, spre exemplu, acidul uric - derivat al purinei, a fost descoperit încă din 1776 de către Scheele.

In cele ce urmează se prezintă principalele baze azotate heterociclice, redându-se aspectele structurale ale pirimidinei şi purinei, urmate de caracterizarea fiecărei baze sub raportul principalelor proprietăți fizico-chimice. Dintre acestea o importanță majoră prezintă tautomeria, implicată în procesele de stabilizare-destabilizare ale bazelor în cursul diferitelor interacții in vitro şi in vivo.

3.2.2.1. Nucleobaze pirimidinice

Pirimidina este un heterociclu hexaatomic care are doi atomi de azot, deci o diazină (numele provenit din combinarea termenilor de piridină şi amidină). Diverşi derivați ai pirimidinei intră în compoziția acizilor nucleici şi a unor medicamente sintetice (e.g.hipnotice, barbiturice, sulfamide etc.).

Inelul pirimidinic are un caracter cvasiaromatic, formal considerându-se că heterociclii hexaatomici derivă din benzen prin substituirea unei grupe =CH– cu un heteroatom, în speță =N–, capabil de a furniza un electron p sextetului aromatic.

Dintre nucleobazele pirimidinice aflate natural în acizii nucleici, aşa cum s-a arătat, mai importante sunt citozina (C), uracilul (U), şi timina (T). Structura chimică a pirimidinei (Py) şi a bazelor amintite se redă în fig. 3-4.

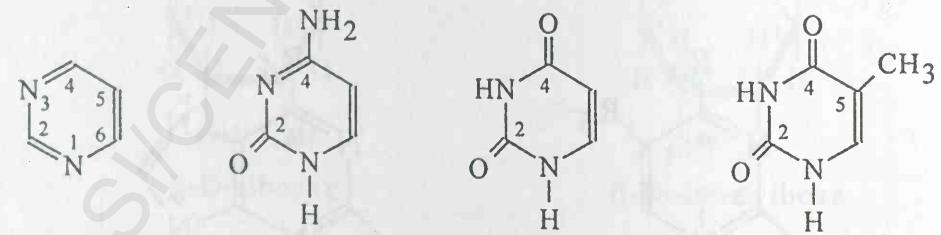


Fig. 3-4. Pirimidina şi principalele baze pirimidinice.
(I) Pirimidina; (II) Citozina; (III) Uracil; (IV) Timina

BCU IASI/CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Citozina (2-oxi-4-amino-pirimidina) a fost descoperită în produşii de hidroliză ai acidului timonucleic de către A.Kossel şi A.Neuman (1894). Se întâlneşte atât în RNA cât şi în DNA.

Gruparea aminică din molecula citozinei determină apariţia tautomeriei de tip amină-imină. Prezenţa grupării $-NH_2$ conferă citozinei bazicitate crescută. Comparativ cu uracilul care are un caracter slab bazic, citozina este o bază relativ tare. Fiind o oxiamino-pirimidină, citozina prezintă şi o tautomerie de tip ceto-enol (lactam-lactim)

Uracilul (2,4-dioxi-pirimidina) a fost izolat de A. Ascoli (1900) din acizii nucleici existenţi în drojdie. Se află doar în RNA. Existenţa grupei –OH, care poate participa la legătura de hidrogen are ca rezultat reducerea solubilităţii în apă.

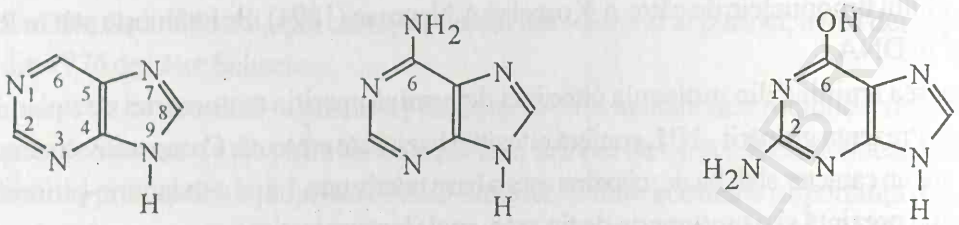
Si în cazul uracilului se sesizează fenomenul de tautomerie. Este o tautomerie ceto-enolică (lactam-lactimică), care se pretează la patru moduri de formulare. Prin pierderea unui proton de la grupa –OH a formulei enolice (lactimice) sau de la grupa –NH2 a formei cetonice (lactamice) se obţine un anion cu posibilităţi de conjugare mărite. Aceasta explică caracterul acid al hidroxi-pirimidinelor.

Timina (2,4-dioxi-5-metil-pirimidina) s-a izolat din hidrolizatele acide de timus de către A. Kossel şi A. Neuman (1893). Este o bază azotată specifică pentru DNA. Cercetări ulterioare întreprinse în 1961 de Mandel şi Borek au condus la izolarea şi din unele extracte de RNA. Asemănător uracilului, timina evidenţiază tautomeria ceto-enolică (lactam-lactimică).

3.2.2.2. Nucleobaze purinice

Purina este un heterociclu care are formal în compoziţia sa un nucleu pirimidinic şi unul imidazolic (termenul derivă de la cuvintele "purum" şi "uricum"). In natură purina (Pu) nu se află liberă, derivaţi ai acesteia însă, prezintă importanţa vitală intrând în compoziţia acizilor nucleici, a unor coenzime nucleotidice, în compoziţia ATP etc. In acizii nucleici se află îndeosebi doi derivaţi: adenina (A) şi guanina (G). In fig. 3-5 se prezintă formulele structurale ale purinei şi principalilor săi derivaţi.

Adenina (6-amino-purina) a fost izolată de A. Kossel (1885) din ţesuturi pancreatice. Solubilitatea în apă este redusă. Dacă la purină este 1:2, la adenina acest raport este mult mai scăzut. Si în cazul adeninei se întâlneşte fenomenul de tautomerie tip amină-imină. Cu acizii minerali adenina formează compuşi stabili. Se dizolvă în alcali şi amoniac, rezultând săruri.



Purina (Pu) (I) Adenina (A) (II) Guanina (G) (III)

Fig. 3-5. Purina şi principalele baze purinic
(I) Purina; (II) Adenina; (III) Guanina

In tabelul 3-1 se prezintă date asupra unor caracteristici fizico-chimice ale principalelor nucleobaze din acizii nucleici.

Tabel 3-1. Caracteristici fizico- chimice ale nucleobazelor.

Nucleobaze	Simbol	Formula brută	Greutate moleculară	Solubilitate nucleobaze/ apă
Citozină	C	$C_4H_5N_3O$	111,11	1:120
Uracil	U	$C_4H_4N_2O_2$	112,09	1:280
Timina	T	$C_5H_5N_2O_2$	126,12	1:250
Adenina	A	$C_5H_5N_5$	135,13	1:1086
Guanina	G	$C_5H_5N_5O$	151,14	1:26000

Guanina (2-amino-6-oxipurina) s-a izolat din guano de către B.Unger (1846). Solubilitatea în apă este extrem de redusă. Este insolubilă în alcool şi eter, solubilă în alcali şi acizi.

Guanina prezintă formulele tautomere ceto-enolică (lactam-lactimică). Fiind o oxi-amino-purină guanina poate prezenta şi un alt tip de tautomerie şi anume tautomeria amin-iminică. Modificările structurale în acest caz apar la nivelul legăturii 1-2 din heterociclu.

3.2.2.3. Nucleobaze cu incidentă redusă

In afara nucleobazelor pirimidinice şi purinice menţionate în puţine cazuri se pot întâlni şi alţi derivaţi, consideraţi cu "incidenţă redusă".

Intre aceştia, din extractele de acizi nucleici, au fost izolate diverse *nucleobaze pirimidinice rare*: **5-metil-citozina** (2-oxi-4-amino- şi 5-metil-pirimidina) notată 5-MC - prezentă în ţesuturi vegetale şi animale; **5-hidroximetil-citozina** (2-oxi-4-amino-5-hidroximetil-pirimidina), notată 5-HMC - descoperită în bacteriofagul de tip T al bacteriei Escherichia coli; **5-hidroximetil-uracilul** (2,4-dioxi-5-hidroximetil-pirimidina), abreviat prin 5-HMU - izolată de la bacteriofagul din seria SP8 fără a fi prezent la alţi fagi de tipul SP. In cazuri rare, sau mai izolat **5-halogeno-uracilul** (cu Br sau F) şi **5-brom-citozina**.

De asemenea, s-au aflat *nucleobaze purinice rare*, între acestea menţionându-se: **6-metil-adenina** (6-metil-amino-purina), notată 6-MA, care a fost descoperită în unele bacterii şi apoi în pneumococi şi **2-metiladenina**, notată 2-MA, cu o incidenţă mult mai redusă.

Se remarcă faptul că bazele azotate heterociclice diferă prin diverşii substituenţi (R_i) grefaţi pirimidinei (la C_2, C_4 şi C_5) şi purinei (la C_2 şi C_6). In fig. 3-3 s-au redat heterociclii cu evidenţierea poziţiilor în care pot să apară substituenţii.

Substituenţii (R_i), diferiţi prin poziţie şi compoziţie, definesc varietatea structurală a derivaţilor respectivi. Indicele i corespunde atomului de carbon de care se leagă substituentul. Tabelul 3-2 prezintă date sinoptice privind structura heterociclilor pirimidinic şi purinic, a principalelor baze azotate şi a unor baze cu incidenţă redusă.

Tabel 3-2. Principalii derivaţi ai bazelor azotate heterociclice

Denumirea compusului	Simbol uzual	Substituenţi ($-R_i$)			
		$-R_2$	$-R_4$	$-R_5$	$-R_6$
Pirimidina	Py	-H	-H	-H	-H
Citozina	C	-OH	$-NH_2$	-H	-H
Uracil	U	-OH	-OH	-H	-H
Timina	T	-OH	-OH	$-CH_3$	-H
5- metil- citozina	5- MC	-OH	$-NH_2$	$-CH_3$	-H
5- hidroximetil- citozina	5- HMC	-OH	$-NH_2$	$-CH_3$-OH	-H
5- bromo- citozina	5- BC	-OH	$-NH_2$	-Br	-H
5- hidroximetil- uracil	5- HMU	-OH	-OH	$-CH_3$-OH	-H
5- fluoro- uracil	5- FU	-OH	-OH	-F	-H
5- tio- uracil		-OH	-OH	-SH	-H
Purina	Pu	-H	-H	-H	-H
Adenina	A	-H	-H	-H	$-NH_2$
Guanina	G	$-NH_2$	-H	-H	-OH
2- metil- adenina	2- MA	$-CH_3$	-H	-H	$-NH_2$
6- metil- amino- purina		-H	-H	-H	-NH-CH_3
N- dimetil- guanina		$-N(CH_3)_2$	-H	-H	-OH
Hipoxantina	HX	-H	-H	-H	-OH
Xantina	X	-OH	-H	-H	-OH

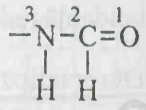
În afară de compuşii menţionaţi există şi alte baze "minore" (termen generic care defineşte bazele cu incidenţă redusă), în care nucleul pirimidinic poate avea substituenţi în N sau C, iar nucleul purinic în N (Davidson, 1972). Bazele minore suscită interes pentru cercetările de biologie moleculară care urmăresc aspecte de patogeneză indusă de agenţi fizici şi chimici.

3.2.2.4. Tautomeria nucleobazelor

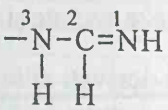
Aşa cum s-a văzut, la bazele azotate heterociclice se întâlneşte în mod curent fenomenul de tautomerie. Transformările tautomere reprezintă un tip de izomerie dinamică întâlnit la numeroase substanţe organice având în moleculă un sistem tricentric nesaturat. La sistemele tricentrice nesaturate pot participa atomii de: C, N, O şi S.

Tautomeria defineşte izomerizarea în urma căreia în masa unei substanţe (în stare gazoasă, lichidă sau în soluţie), se află în echilibru moleculele care posedă structuri corespunzătoare unor izomeri diferiţi prin poziţia unei duble legături şi a unui atom de hidrogen.

In cazul bazelor pirimidinice şi purinice sistemele tricentrice întâlnite sunt de tipul:

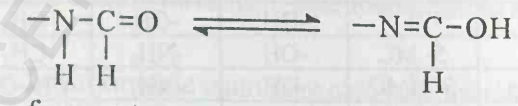


(I)



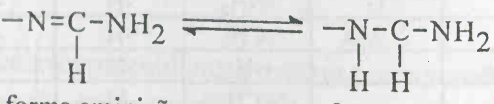
(II)

Dintre acestea tipul (I) se întâlneşte în tautomeria lactam-lactimică (ceto-enolică):



forma ceto (lactam) — forma enol (lactim)

iar tipul (II) se întâlneşte în tautomeria amin-iminică:



forma aminică — forma iminică

BCU IASI/CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Stările tautomere posibile prezintă nivele deosebite ale energiei de rezonanță. Atomii constituenți ai nucleobazelor pirimidinice și purinice sunt legați între ei prin legături covalente. Aceste legături iau naștere prin întrepătrunderea orbitalilor atomici care formează moleculele respective.

In abordarea mecanic-cuantică a acestor sisteme se consideră că electronii în mișcarea lor au o comportare dublă (de unde și de corpusculi), astfel că mișcarea electronilor poate fi definită prin ecuații de undă. Aplicând calcule mecanic-cuantice specifice pentru legătura de valența (valence-bond) se poate considera că fiecare schemă de valență poate fi caracterizată printr-o funcție de undă:

$$\Psi_1, \Psi_2, \ldots\ldots\ldots\ldots\ldots, \Psi_n$$

Funcția de undă a moleculei reale convenim a o nota prin Ψ_0, acesta putându-se prezenta ca o combinație lineară a tuturor funcțiilor de undă posibile:

$$\Psi_0 = a\Psi_1 + b\Psi_2 + \ldots\ldots\ldots + k\Psi_n$$

în care: a, b, ..., k - reprezintă coeficienți ai căror valoare se calculează punând condiția ca energia moleculei să fie minimă.

Funcția de undă a moleculei reale corespunde celei mai mici energii, respectiv celei mai mari stabilități a sistemului. Această metodă de calcul se poate aplica atât unor forme canonice care diferă prin așezarea electronilor, dar și prin formele tautomere ale bazelor azotate heterociclice discutate în cazul de față (Pullman și Weissbluth, 1965; Sprecher și Johnson, 1977).

Diferența dintre energia structurii reale E_0 calculabilă prin Ψ_0 și energia corespunzătoare uneia din funcțiile Ψ_1, Ψ_2, ..., Ψ_n, respectiv E_1, E_2, ..., En reprezintă energia de delocalizare sau energia de rezonanță ΔE.

Dacă vom reprezenta formulele tautomere a-d întâlnite spre exemplu în cazul timinei se vor distinge structurile: (a) dicetonică; (b) și (c) ceto-enolice; (d) dienolică.

Intre formele limită (a) și (d) există forme tranzitorii (b) și (c) caracterizate prin energii diferite. Valorile E_a, E_b, E_c, E_d reprezintă energiile diverselor forme tautomere, iar E_0 energia structurii reale.

Formulările detailate ale formulelor tautomere la bazele organice heterociclice se prezintă în fig. 3-6.

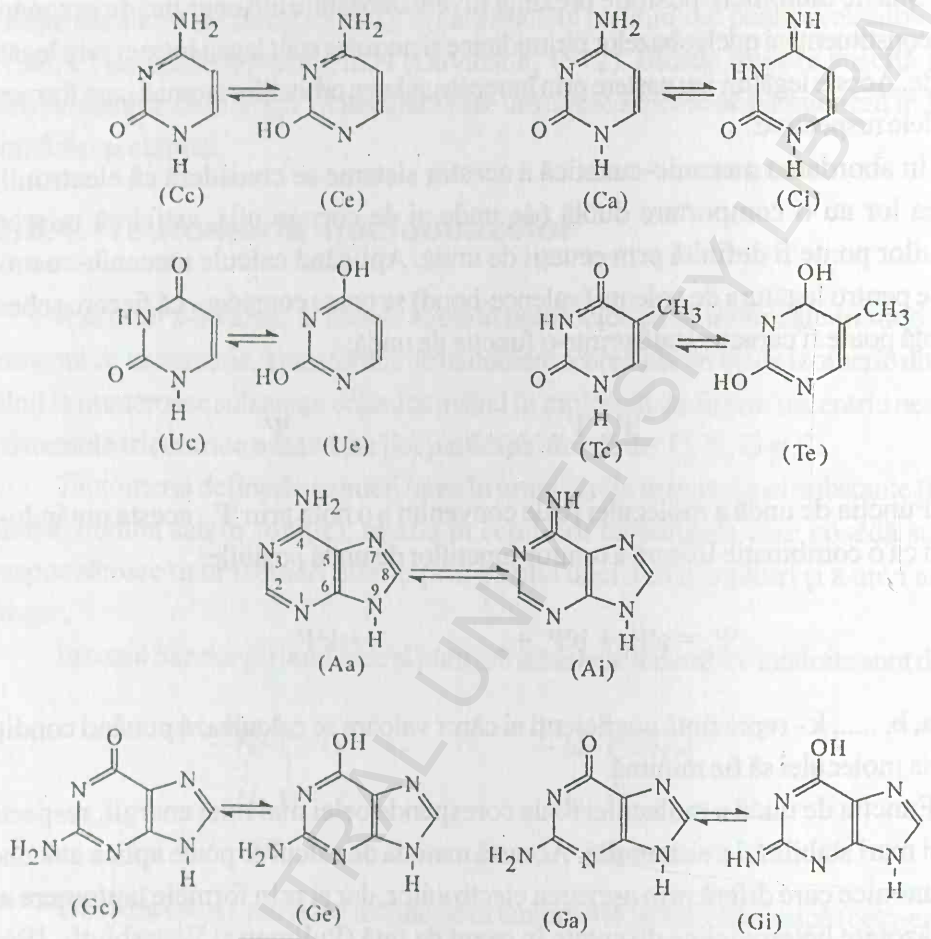


Fig. 3-6. Tautomeria bazelor azotate heterociclice.
Indicele redă tipul de tautomerie ceto(c)-enolică(e) şi amin(a)-iminică(i)

Conform teoriei, energia de rezonanţă ΔE este o măsură a stabilităţii moleculei reale. Formele tautomere întâlnite la bazele pirimidinice şi purinice prezintă valori diferite ale energiei de rezonanţă.

In tautomeria lactam-lactimică, trecerea formei lactam (cetonică), cea mai stabilă, în forma lactim (enolică), este însoţită de o creştere a energiei de rezonanţă. Deci proporţia formei lactim va creşte odată cu creşterea energiei de rezonanţă.

In tautomeria amin-iminică trecera formei amino, cu stabilitate mai ridicată, în forma imino este însoţită, de asemenea, de creşterea energiei de rezonanţă. Se observă

BCU "I.C. CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

deci că energia mai scăzută a unei structuri conferă acesteia o stabilitate mai mare, aceasta explică de ce formele lactam şi amino se întâlnesc în mod obişnuit la aceste baze.

Studiul spectrelor în infraroşu şi ultraviolet arată că în macromoleculele acizilor nucleici se află în mod curent formele mai stabile, respectiv formele lactam şi amino. Apariţia formelor tautomere rare, lactim şi imino în structura acizilor nucleici poate avea consecinţe asupra transmiterii mesajului informaţional. Perturbările posibile implică, sub raport biologic, declanşarea unor procese mutagene (Sengbush, 1979; Alberts et al., 1986; Garban, 1992).

3.2.3. ACIDUL FOSFORIC

In moleculele de acizi nucleici legarea pentozelor în lanţul macromolecular se realizează prin acidul fosforic (H_3PO_4). Acesta realizează legăturile fosfoesterice între două resturi nucleozidice care conţin pentoze (riboza sau deoxiriboza) vicinale (fig.3-7).

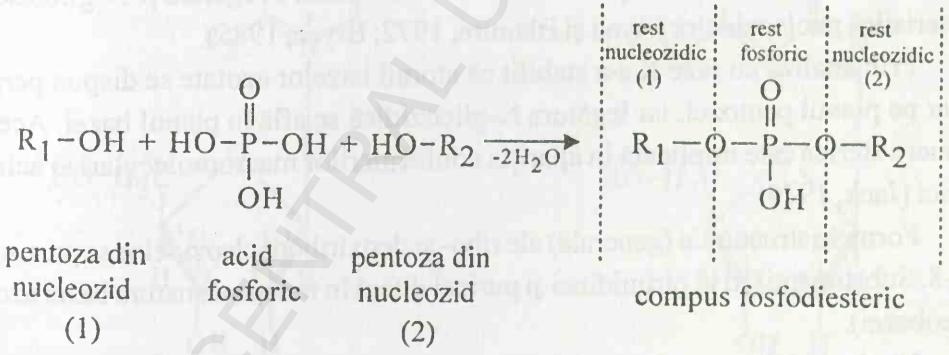


Fig. 3-7. Formarea legăturii fosfodiesterice internucleozidice

Astfel se leagă nucleotidele în cadrul unei structuri de tip monovalent, caracteristică în fapt structurii primare.

Datorită faptului că acidul fosforic apare în formule ca un "rest" din moleculă, se uzează uneori şi de expresia "fosfat" , e.g. în cazul nucleozidmonofosfaţilor, nucleoziddifosfaţilor etc. In notarea curentă restul fosfatic dihidrogenat ($-PO_3H_2$) - considerat ca fosfat anorganic este abreviat în diverse moduri: - P_i sau P_a, iar uneori este simbolizat prin (P) (încercuit). Acest rest $-P_i$ este prezent în legătura fosfodiesterică.

In cazul formării unor compuşi fosfodiesterici (v.fig.3-7) restul fosfatic

monohidrogenat ($-PO_2H^-$) notat $-P_i-$ reprezintă o punte de legătură, e.g.: cazul legăturii internucleotidice.

Există situaţii în care urmarea interacţiilor biochimice, se eliberează compuşi cu structură de difosfaţi (H_2PO_3-O-H_2PO_3). Aceştia se notează uzual prin P_i - P_i. Evident aceşti compuşi în sistemele biologice nu se află sub forma de resturi de ortofosfaţi ($-PO_2$-O-PO_2H-), nu sub forma de acid ortofosforic cum sunt prezentaţi în scrierea curentă din considerente de ordin didactic.

3.3. PRECURSORI STRUCTURALI

3.3.1. NUCLEOZIDE

Nucleozidele sunt combinaţii N-glicozidice heterociclice în compoziţia cărora intră o nucleobază pirimidinică sau purinică şi o pentoză (riboza sau deoxiriboza). Legarea componentelor se face la N_1 al bazelor pirimidinice sau N_9 al bazelor purinice şi hidroxilul glicozidic (semiacetalic) de la carbonul C_1. al β-D ribozei (r) sau C_1. al β-2'-deoxi-D ribozei (d). Deci între pentoze şi nucleobaze se realizează o legătură β-N-glicozidică, caracteristică nucleozidelor (Ayad şi Blamire, 1972; Bryce, 1985).

Prin analiza cu raze X s-a stabilit că atomii bazelor azotate se dispun perpendicular pe planul pentozei, iar legătura N-glicozidică se află în planul bazei. Această dispunere sterică este implicată în apariţia conformerilor macromoleculari ai acizilor nucleici (Jack, 1979).

Formele structurale (generale) ale ribo- şi deoxiribonucleozidelor se prezintă în fig. 3-8. Substituenţii Ri ai pirimidinei şi purinei diferă în funcţie de natura bazei azotate (nucleobazei).

Nucleozidele sunt denumite prin utilizarea prefixelor *ribozil-*, respectiv *deoxiribozil-* la care se adaugă numele bazei azotate. La scrierea prin abreviere, prefixul este notat prin r- sau d-, circumscriindu-se apartenenţa compusului la ribonucleozide, respectiv la deoxiribonucleozide. Astfel, de la adenină derivă riboziladenina (rA) şi deoxiriboziladenina (dA), iar de la citozină derivă ribozilcitozina (rC) şi deoxiribozilcitozina (dC) ş.a.m.d. Simbolurile din paranteze reprezintă simbolurile utilizate în mod curent pentru nucleozide (tabel 3-3).

Mai puţin uzitate, în literatura de specialitate actuală, sunt denumirile derivate de la bazele azotate prin adăugarea sufixelor: **-idina**, pentru derivaţi pirimidinici şi **-ozina**,

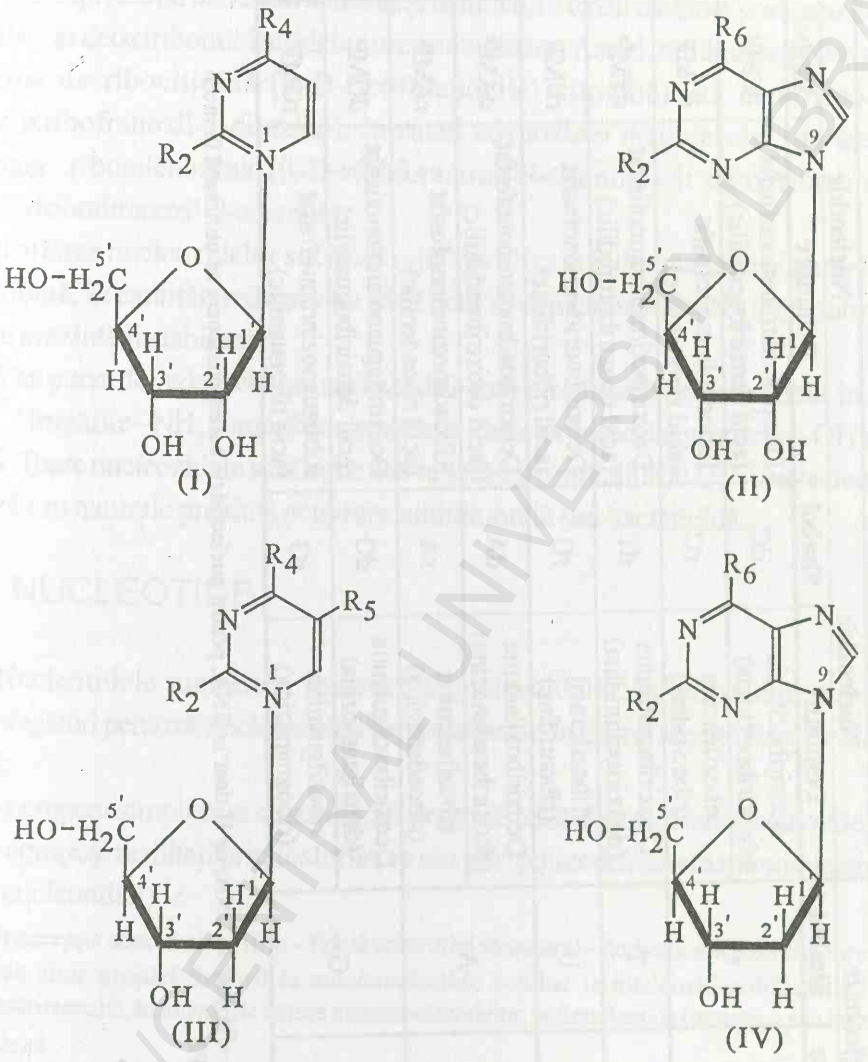


Fig. 3-8. Structuri moleculare ale nucleozidelor
(I) pirimidin-ribonucleozide; (II) purin-ribonucleozide;
(III) pirimidin-deoxiribonucleozide; (IV) purin-deoxiribonucleozide

pentru derivații purinici. Numele acestora vor fi: citidina, timidina, uridina și, respectiv, adenozina, guanozina.

BCU IASI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Tabel 3-3. Nucleobaze, nucleozide şi nucleotide din DNA şi RNA

Nr. crt.	Derivaţi	Nucleobaze		Nucleozide		Nucleotide	
		Denumire	Simbol	Denumire	Simbol	Denumire	Simbol
1	Pirimidinici	Citozina	C	deoxiribocitozia (deoxiribocitidina)	dC	Deoxiribocitidinmonofosfat (acid deoxiribocitidilic)	dCMP
				ribozilcitozia (ribocitidina)	rC	Ribocitidinmonofosfat (acid ribocitidilic)	rCMP
2		Timina	T	Deoxiriboziltimina (deoxiribotimidina)	dT	Deoxiribotimidinmonofosfat (acid deoxiribotimidilic)	dTMP
3		Uracil	U	Riboziluracil (ribouridina)	rU	Deoxiribouridinmonofosfat (acid ribouridinic)	rUMP
4	Purinici	Adenina	A	Deoxiriboziladenia (deoxiriboadenozina)	dA	Deoxiriboadenozinmonofosfat (acid deoxiriboadenilic)	dAMP
				riboziladenina (riboadenozina)	rA	Riboadenozinmonofosfat (acid riboadenilic)	rAMP
5		Guanina	G	Deoxiribozilguanina (deoxiguanozina)	dG	Deoxiriboguanozinmonofosfat (acid deoxiriboguanilic)	dGMP
				ribozilguanina (riboguanozina)	rG	Riboguanozinmonofosfat (acid riboguanilic)	rGMP

Notă. Având în vedere faptul că T se află doar în DNA, iar U doar în RNA, pentru nucleotidele corespunzătoare se utilizează în mod curent notaţiile TMP, respectiv UMPS

BCU TRANSILVANIA UNIVERSITY LIBRARY

Exemplificând denumirea uzuală şi chimică, în cazul citidinei şi adenozinei se pot defini ribo- şi deoxiribonucleotidele corespunzătoare. Astfel, citidina se poate prezenta sub formă de ribocitidină (β-D-ribofuranozil-1-citozină) sau deoxiribocitidina (β-D-deoxribofranozil-1-citozină). In cazul adenozinei s-au decelat, de asemenea, 2 compuşi: riboadenozina (β-D-ribofuranozil-9-adenină) şi deoxiriboadenozina (β-D-deoxiribofuranozil-9-adenină).

Izolarea nucleozidelor s-a făcut prin hidroliza acizilor nucleici şi nucleotidelor. In stare liberă, în cantităţi reduse s-au găsit doar ribonucleozidele. Nu s-au putut decela deoarece prezintă instabilitate.

Din punct de vedere chimic nucleozidele sunt substanţe incolore, solubile în solvenţi organici. Grupările $-NH_2$ conferă nucleozidelor caracter bazic, iar grupările –OH caracter slab acid. Toate nucleozidele sunt optic active şi absorb radiaţiile în UV. Unele nucleozide de sinteză sau naturale prezintă activitate antitumorală sau bactericidă.

3.3.2. NUCLEOTIDE

Nucleotidele sunt esteri fosforici ai nucleozidelor. In moleculele acestora se întâlnesc legături pentoză-nucleobază şi pentoză-fosfat. In cadrul acestei clase de substanţe se includ:

- compuşi simpli care conţin triada pentoză-bază-fosfat (mononucleotide);
- compuşi rezultaţi prin fosforilarea sau prin policondensarea mononucleotidelor (derivaţi nucleotidici).

In accepţia acestei clasificări - fidelă criteriului structural - derivaţii nucleotidici formaţi prin esterificarea altor grupări fosforil la mononucleotide conduc la nucleozid-polifosfaţi. In cazul policondensării rezultă, în funcţie de natura mononucleotidelor, polinucleotide (omogene sau heterogene) şi acizi nucleici.

3.3.2.1. Mononucleotide

La formarea acestora, gruparea fosfat se fixează la unul din hidroxilii liberi ai pentozei. La *hidroliză parţială* se eliberează esteri fosforici ai nucleozidelor şi esteri fosforici ai pentozei.

La hidroliza *totală* apar molecule de pentoză, nucleobaze pirimidinice sau purinice şi acid fosforic.

Nomenclatura mononucleotidelor are în vedere natura nucleobazelor şi pentozelor

constituente (v. tabel 3-3). Din datele expuse mai sus reiese că în funcţie de: a) natura bazelor azotate heterociclice se pot distinge: pirimidin- şi purinmononucleotide; b) natura pentozei se pot întâlni: ribo- şi deoxiribomononucleotide (numite şi ribotide, respectiv deoxiribotide).

Ribomononucleotidele pot fi fosforilate la atomul de C din poziţiile $C_{2'}$, $C_{3'}$ şi $C_{5'}$, rezultând esteri monofosforici. Pot exista şi nucleotide ciclice (diesteri) când molecula de acid fosforic esterifică două funcţiuni hidroxil ale ozei: esterii ciclici $C_{2'}$-$C_{3'}$ sau $C_{3'}$-$C_{5'}$. Deoxiribomononucleotidele sunt fosforilate doar în poziţiile $C_{3'}$ sau $C_{5'}$ (deoarece atomul $C^{2'}$ nu este hidroxilat) şi prezintă doar un ester ciclic 3'-5'.

Diferitele structuri întâlnite la mononucleotide ca urmare a fosforilării nucleobazelor sunt prezentate în fig. 3-9.

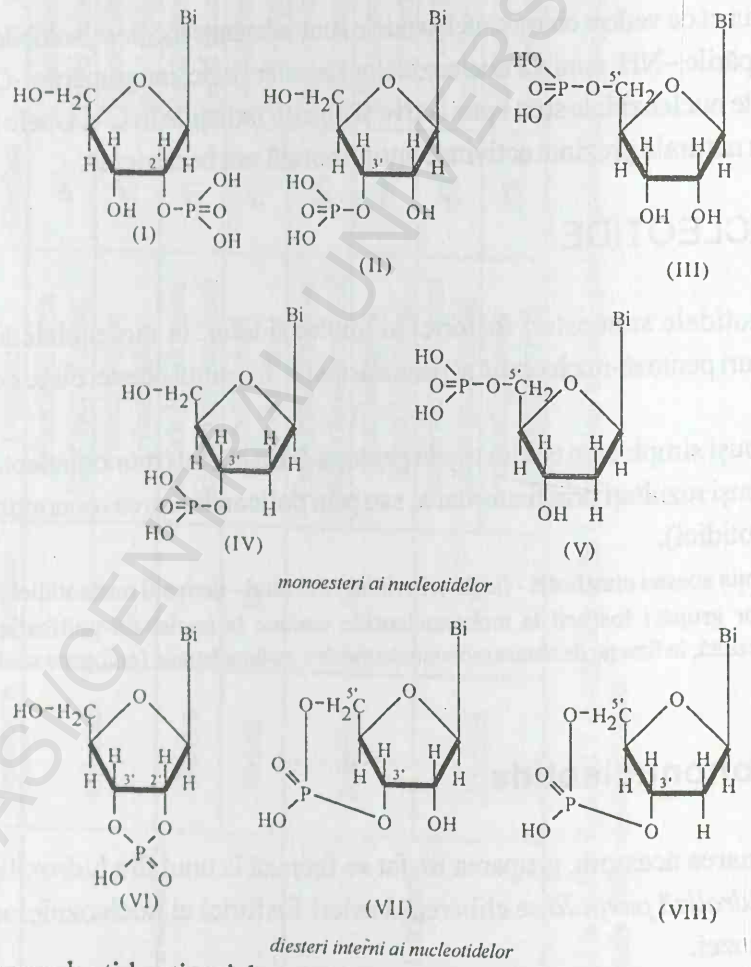


Fig. 3-9. Mononucleotide - tipuri de esteri (formule reprezentative)
Monoesteri ribonucleotidici (I), (II), (III) şi deoxiribonucleotidici (IV), (V).
Diesteri interni (esteri ciclici) ribonucleotidici (VI), (VII) şi deoxiribonucleotidic (VIII)

BCU IAŞI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Mononucleotidele fiind derivaţi monofosforilaţi au fost denumite şi acizi, e.g. **acid citidilic** - provenit de la citozină, **acid adenilic** - provenit de la adenină etc. Pe de altă parte având în vedere formarea acestora din nucleozide şi acid fosforic se denumesc şi în funcţie de nucleozidul de provenienţă, e.g. pentru aceeaşi compuşi: **citidinmonofosfat** (CMP), respectiv **adenozinmonofosfat** (AMP).

In funcţie de natura pentozei, în faţa notării abreviate se adaugă r-pentru ribonucleotde şi d-pentru deoxiribonucleotide. Astfel, exemplificând în cazul nucleotidelor de mai sus se poate nota rCMP şi dCMP, respectiv, rAMP şi dAMP.

Pentru a simplifica notările respective, uzual la ribomononucleotide se ignoră menţionarea literei r (CMP şi AMP), însă se scrie d în cazul deoxiribomononucleotidelor (dCMP şi dAMP).

In cazurile concrete se precizează şi poziţia la care s-a făcut esterificarea. Astfel, există nucleotide esterificate la C_5, denumite curent nucleozid-5'-monofosfat.

La hidroliza acidă sau enzimatică a acizilor nucleici se eliberează şi analogi ai nucleotidelor amintite, esterificaţi la C_2, şi C_3, (doar la ribonucleotide). Acestea sunt denumite nucleozid-2'-fosfaţi respectiv nucleozid-3'-fosfat. Izolarea nucleotidelor s-a reuşit din diverse medii. Astfel, spre exemplu, acidul adenozin-5'-monofosforic (derivatul dAMP) s-a decelat în levuri, iar acidul adenozin-2'-monofosforic (derivatul rAMP) întâlnit în structura NADP enzima participantă la diverse procese redox biologice.

Nucleotidele cu structură de nucleozid-5'-fosfaţi există sub forma de: ribonucleotide rCMP, rUMP, rAMP, rGMP şi deoxiribonucleotide dCMP, dTMP, dAMP, dGMP. In scrierea abreviată se poate face abstracţie de prefixarea prin "r" în cazul UMP şi prefixarea prin "d" în cazul TMP (în legarea bază-pentoză existând aproape exclusiv uracil-riboza şi timin-deoxiriboza).

In cazuri rare pot exista şi alte mononucleotide, cum ar fi acidul deoxiuridilic, nucleotide sulfurate şi nucleotide cu baze metilate sau hidroximetilate. O menţiune aparte se face asupra esterului forforic în care există legarea ribozei la C_1, cu uracilul la C_5 compus denumit **acid pseudouridilic** notat prin UMP.

La hidroliza acizilor nucleici s-au mai izolat şi **mononucleotide ciclice** cu structura de diesteri interni (esteri ciclici). Unele din acestea pot exista şi în stare liberă, spre exemplu: acidul 3'-5'-ciclodeoxiriboadenilic sau acidul adenozin-3', 5'-monofosforic ciclic (cAMP). Acesta are rol de coenzimă într-o fosforilază foarte activă a metabolismului glucidelor. A fost izolat din ţesuturi asupra cărora acţionează hormoni de natura polipeptidică considerându-se că are rol de mesager al acţiunii hormonale (Sutherland,

1972). Acidul adenilic (AMP) neciclizat s-a izolat, din ţesuturi - sub formă de acid adenozin-5'-fosforic, şi din levuri - sub formă de acid adenozin-3'-fosforic.

Cercetările asupra mecanismului de acţiune al hormonilor polipeptidici au dus şi la izolarea altui mononucleotid ciclic, acidul guanozin-3',5'-monofosforic ciclic (cGMP) cu rol similar.

Din punct de vedere chimic mononucleotidele sunt substanţe solide, incolore, solubile în apă, insolubile în solvenţi organici. Prezintă caracter acid şi formează săruri (de sodiu, potasiu şi bariu) cu caracter cristalin. Evidenţiază activitate optică. Mononucleotidele hidrolizează uşor în mediu acid, o rezistenţă mai mare având pirimidinnucleotidele.

3.3.2.2. Derivati nucleotidici

Compuşii din subclasa derivaţilor nucleotidici sunt formaţi prin: a)- di- şi trifosforilarea mononucleotidelor, fiind denumiţi adesea **nucleotid polifosfaţi;** b)- policondensarea homo- sau heteronucleotidelor, rezultând astfel **polinucleotidele.**

3.3.2.2.1. Nucleotid polifosfati

Aceşti derivaţi nucleotidici se formează prin esterificarea a două sau trei resturi de acid fosforic la nucleozide. In moleculele acestora, între grupările esterificate apar legături de tip special (Lipman, 1941) - *legături macroergice* (simbolizate prin semnul ~) la a căror desfacere se eliberează o însemnată cantitate de energie.

Se consideră cazul nucleobazei adenina (A) care cu deoxiriboza va putea forma nucleozidul deoxiriboziladenina sau deoxiriboadenozina (dA). Aceasta prin fosforilare poate genera: deoxiriboadenozinmonofosfatul (dAMP) sau simplu adenozinmonofosfatul (AMP). De fapt pot rezulta: adenozinmono- fosfatul (AMP), adenozindifosfatul (ADP) şi adenozintrifosfatul (ATP) - v. fig 3-10. In compuşii ADP si ATP apar legături macroergice.

După numărul resturilor de acid fosforic se disting nucleotide mono-, di- şi trifosfatate (gruparea fosfat se poate nota convenţional prin P). La scrierea curentă a acestor nucleotide se are în vedere numărul de grupări fosfat. In cazul menţiunilor speciale se trece şi poziţia esterificării primei grupări fosfatice, spre exemplu, *nucleozid-5'-difosfat.*

Astfel de compuşi generează toate nucleozidele pirimidinice şi purinice. Denumirea şi abrevierea nucleozid-polifosfaţilor prezintă similitudini. Derivaţii proveniţi de la alte nucleozide, se vor nota după cum urmează: GDP, CDP, TDP, UDP - compuşii difosfataţi şi

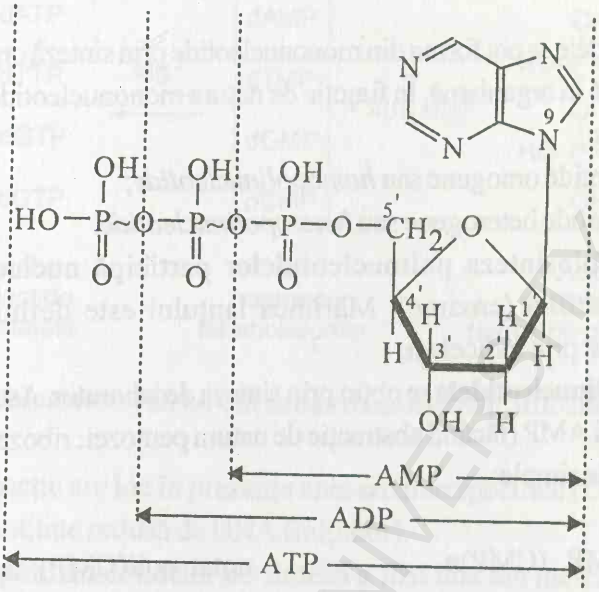


Fig. 3-10. Adenozinfosfaţii mono-, di- şi triesterificaţi (formule generale)

In schimburile energetice energia absorbită la fosforilare se eliberează la hidroliză. Cuantumul energiei eliberate este mult mai mare în cazul ruperii unei legături fosfatice macroergice, comparativ cu ruperea legăturii fosfatice simple. Astfel, prin hidroliză, legătura **macroergică** eliberează o energie de 33,5 KJ/mol (cca. 7-9 Kcal/mol fosfat), iar legătura **microergică** din esterul fosforic simplu eliberează o energie de 17 KJ/mol (cca 2-3 Kcal/mol fosfat). In procesele de hidroliză participă ionii de Mg care pot forma complecşi de tipul Mg-ATP şi Mg-ADP ca structuri tranzitorii în reacţii reversibile.

In afară de nucleozid-polifosfaţii menţionaţi s-au identificat şi *compuşi cu 4-5 grupări fosfat* legate atât la C_3, cât şi la C_5, al pentozei. Astfel, s-au decelat derivaţii guanozin-5'-difosfat-3'-difosfat - un compus tetrafosfatat şi guanozin-5'-trifosfat-3'-difosfat - un compus pentafosfatat, implicat în transcrierea informaţiei genetice la bacterii.

De remarcat faptul că în afară de aportul energetic (realizat ca o consecinţă a hidrolizei), aceşti compuşi participă în diverse etape ale metabolismului intermediar la procesele de biosinteză.

Astfel, nucleozid-trifosfaţii participă, ca precursori, la biosinteza ARN şi ADN. Alţi compuşi, cum ar fi uridin-difosfo-glucoza (UDPGlc) participă la transportul ozelor şi amino-alcoolilor, iar ATP este constituent al coenzimelor.

3.3.2.2.2. Polinucleotide

Polinucleotidele se pot forma din mononucleotide prin sinteză organică în laborator şi/sau prin biosinteză în organisme. În funcţie de natura mononucleotidelor care participă la sinteză pot rezulta:

a) polinucleotide omogene sau *homopolinucleotide*;

b) polinucleotide heterogene sau *heteropolinucleotide*.

La sinteza/biosinteza polinucleotidelor participă nucleozidtrifosfaţii şi biocatalizatorii specifici (enzime). Mărimea lanţului este definită de gradul de policondensare, notat prin indicele n.

A. Homopolinucleotidele se obţin prin sinteza de laborator. Astfel, spre exemplu, pornind de la CMP şi AMP (făcând abstracţie de natura pentozei: riboza sau deoxiriboza) rezultă polinucleotide simple:

n CMP (CMP)n, notat poli(CMP) sau poli C

n AMP (AMP)n, notat poli(AMP) sau poli A

B. Heteropolinucleotidele pot fi de sinteză - obţinute în laborator sau naturale - existente în materia vie. In grupa heteropolinucleotidelor se includ acizii nucleici (respectiv DNA şi RNA).

Polinucleotidele de sinteză, utilizate de obicei cu scop experimental, se pot obţine din două mononucleotide diferite, cum ar fi:

n AMP + n TMP (AMP-TMP)n, notat poli(AMP, TMP) sau poli(A,T)

dar se pot obţine şi din mai multe mononucleotide.

Utilizând mononucleotidele trifosfatate - specifice structurii DNA şi RNA - se pot sintetiza catene ale acestor heteropolinucleotide de interes biologic.

Considerând cazul sintezei sau biosintezei DNA, substratul este format dintr-un amestec de patru deoxiribonucleotide trifosfatate (dAMP, dTMP, dGMP, dCMP) iar în mediu sunt indispensabili ionii de Mg^{2+}. Din reacţie se eliberează acidul pirofosforic, care se va sintetiza sub formă de pirofosfat (fig. 3-11)

BUCHAREST UNIVERSITY LIBRARY

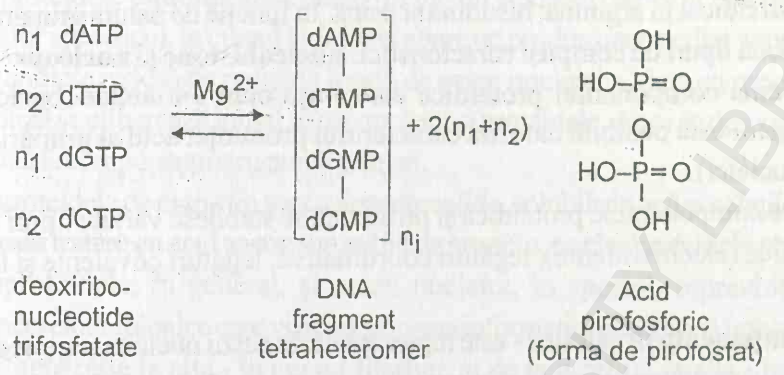


Fig. 3-11. Schema biosintezei DNA din deoxiribonucleotide trifosfatate

Această reacție are loc în prezența unei enzime specifice (DNA polimeraza) și pornește de la o cantitate redusă de DNA (inițiator).

Folosirea polinucleotidelor de sinteză a fost una din metodele fundamentale utilizate în determinarea codului genetic, pornind de la observația că polimerul sintetic poli U (într-un mediu care a conținut 20 aminoacizi) a condus la sinteza unui lanț proteic care a conținut doar resturi de fenilalanină (Nirenberg și Matthaei, 1961). Evident, s-a putut conchide că în acidul ribonucleic mesager mRNA, tripletul UUU reprezintă codonul fenilalaninei.

Cercetări ulterioare utilizând polinucleotide omogene și heterogene (copolimeri nucleotidici) au condus la "descifrarea" codului genetic. Sintezele de polinucleotide au oferit, de asemenea, un important câmp de afirmare în cercetările de genetică (Khorana, 1968).

Aspectele structurale referitoare la acizii nucleici (DNA și RNA) - ca heteropolinucleotide de interes biologic - se prezintă mai detaliat în continuare.

3.4. ACIZII NUCLEICI SI NUCLEOPROTEIDELE

3.4.1. PARTICULARITĂTI STRUCTURALE GENERALE

In materia vie acizii nucleici se află în nucleoproteide. Nucleoproteidele sunt heteroproteide formate dintr-o componentă proteidică - reprezentată, de obicei, prin compuși cu caracter bazic și o componentă prostetică - constituită din acizi nucleici.

Componenta proteidică din nucleoproteide reprezintă cca 60% din masa

moleculară a acestora şi este formată din histone sau protamine. Caracterul bazic este dat de conţinutul ridicat în arginină, histidină şi lisină. În funcţie de natura grupării proteidice se disting două tipuri de compuşi caracteristici: **nucleohistone şi nucleoprotamine.**

Sarcina componentei proteidice este - aşa cum s-a arătat- bazică. Legarea componentelor este posibilă datorită caracterului pronunţat acid al grupării prostetice (i.e. acizi nucleici).

Între componentele proteidică şi prostetică se stabilesc variate tipuri de legături: legături ionice (electrovalente), legături coordinative, legături covalente şi legături van der Waals.

Componenta prostetică - este reprezentată de acizii nucleici, care se diferenţiază prin specificul structural şi prin activitatea biologică existând: acizi ribonucleici (ARN sau RNA) şi acizi deoxiribonucleici (ADN sau DNA). în funcţie de natura acestora se face clasificarea nucleoproteidelor în **ribonucleoproteide şi deoxiribonucleoproteide.**

Aceşti compuşi au o răspândire ubicvitară în organismele procariote şi eucariote din regnul vegetal şi animal. Sub raportul topobiochimiei celulare se relevă localizări diferite ale acizilor nucleici. Acizii ribonucleici se află predilect în ribozomi, în citoplasmă şi în cantităţi mai reduse în nucleoidul celulelor procariotice sau nucleul celulelor eucariotice. Acizii deoxiribonucleici se află localizaţi, îndeosebi, în nucleoidul procariotic, respectiv în nucleul eucariotic.

Sub raport topobiochimic acizii deoxiribonucleici din nucleoidul celulelor procariotice se află în genoforul procariotic (DNA genoforal), iar în nucleul celulelor eucariotice se află în cromsomul eucariotic (DNA cromosomal).

Acidul deoxiribonucleic s-a mai decelat în mitocondrii (DNA mitocondrial) din celulele eucariotice. Acesta este numit adesea şi DNA extracromosomial, considerându-se că asigură ereditatea extracromosomială. In acest context se consideră că mitocondriile au chiar unele "gene" proprii şi există un redus "genom motocondrial" (de Duve, 1991).

De asemenea, s-a constatat că DNA se află în plasmidele (DNA plasmidal) din celulele procariotice. In biologia moleculară DNA plasmidal este utilizat pentru cercetările în domeniul tehnologiei DNA recombinant (v.Cap.4).

În materia vie acelulară (i.e.virusuri) se află, de asemenea, acizi nucleici, cu precizarea că pot exista în exclusivitate sub formă de RNA - în ribovirusuri sau DNA - în deoxiribovirusuri. Dispunerea acizilor nucleici virali se face în core - acizi nucleici coreali (v.Cap.1.3.).

Din punct de vedere structural acizii nucleici sunt compuşi macromoleculari, aşa numite "biomacromolecule" a căror stabilizare în mediul biologic se face prin gruparea proteidică din constituţia nucleoproteidei.

Nucleoproteidele hidrolizează chimic (în mediu acid sau bazic) şi biochimic (în prezenţa enzimelor specifice). În cursul hidrolizei apare un produs intermediar "nucleina", care conţine o cantitate redusă de proteidă legată de acizii nucleici. Odată cu progresarea reacţiei de hidroliză se eliberează iniţial acizii nucleici şi proteidele. Apoi se descompun şi acizii nucleici până la componenţii structurali primari.

Nucleoproteidele de extracţie sunt substanţe solide, solubile în apă şi soluţii bazice. În mediu acid, prin tratare cu acid acetic sau sulfat de amoniu, nucleoproteidele precipită.

Nucleoproteidele, în general, şi acizii nucleici, în special, reprezintă baza moleculară a proceselor biologice care vizează stocarea informaţiei genetice şi transmiterea acesteia de la o generaţie la alta - în cursul filiaţiei, şi de la o celulă la alta - în cursul diviziunii celulare (Haggis et al., 1967; Blorel, 1980; Perutz, 1992).

Importanţa biomedicală şi biotehnologică a acestei clase de compuşi este relevantă prin problematica complexă şi conexă în raport cu biologia moleculară, patologia biochimică, microbiologia industrială (industria alimentară, industria farmaceutică) ş.a.

3.4.2. LEGĂTURI CHIMICE INTRAMOLECULARE

Cu referire la legăturile chimice din biomacromolecule se reiterează observaţiile conform cărora: structura chimică este definită - groso modo - prin natura atomilor, numărul acestora şi modul de legare; activitatea biologică este condiţionată de existenţa unor variate tipuri de legături, care duferă prin lungime, geometrie şi energie de legare.

Legăturile chimice se stabilesc *intramolecular* - între diferite elemente din constituţia unei anumite molecule şi *intermolecular* - între diverse molecule în cursul interacţiilor (legături adesea metastabile) sau în cazul formării unor compuşi stabili de tipul "aducţilor" constituiţi din DNA şi diverşi compuşi chimici aparţinând xenobioticelor (e.g. contaminanţi chimici care însoţesc principiile nutritive; medicamente chimioterapice etc.).

Aducţii cunoscuţi iniţial sub denumirea de "asociaţii moleculare" (Lerman, 1964) se pot forma între DNA şi substanţe cu acţiune carcinogenă e.g. hidrocarburi policiclice aromatice (HPA), ioni ai metalelor (M^{n+}) grele, micotoxine, derivaţi steroidici, etc (Grunberger şi Weinstein; 1979; Gârban et al., 1985). Notarea aducţilor se face prin abrevieri de tipul DNA-HPA, DNA-M^{n+}, etc (v. Cap. 12). De asemenea, aducţi se pot forma în cazul tratamentelor cu chimioterapice citostatice cum ar fi: cisdiclordiaminoplatina (cDDP) sau ciclofosfamida (Cp). În acest caz notarea aducţilor se face prin: DNA-cDDP, DNA-Cp.

Prezentarea acestor date în relaţie cu legăturile chimice intra- şi intermoleculare, în cazul DNA este importantă în biologia moleculară pentru domeniul care studiază carcinogeneza chimică respectiv chimioterapia citostatică.

În acest volum de Biologie moleculară se vor prezenta doar câteva aspecte generale privind legăturile chimice din interiorul moleculei de caizi nucleici (DNA şi RNA). Se

remarcă, totodată, caracterul particular al forţelor (legăturilor) de înstivuire (engl. stacking; fr. empilement). Detalii asupra legăturilor chimice din biomolevule se pot studia consultând diverse tratate de Biochimie.

Pentru înţelegerea diverselor aspecte referitoare la structura chimică şi activitatea biologică a acizilor nucleici în contextul problematicii investigaţiilor din biologia moleculară se vor prezenta succint date referitoare la legăturile intramoleculare.

A. Legătura covalentă.

Legătura covalentă (atomică) se realizează prin punere a în comun a uneia (sau mai multor) perechi de electroni periferici ai atomilor participanţi, realizându-se o configuraţie electronică stabilă. Astfel, se completează octetul (dubletul) electronic al fiecărui atom, prin punerea în comun a unuia, a doi sau trei electroni, funcţie de valenţă.

Interpretată în termenii mecanicii cuantice, legătura covalentă se realizează prin întrepătrunderea orbitalilor atomici (monoelectronici) ai atomilor participanţi. Astfel se formează orbitali comuni, numiţi orbitali moleculari sau orbitali de legătură.

Legăturile covalente sunt caracterizate prin: lungimi (fixe), geometrie sterică, existenţa liberei rotaţii (la legăturile σ), delocalizarea electronilor π etc. În biomolecule legăturile covalente sunt cele mai stabile, având energia de legătură cea mai mare.

B. Legătura electrovalentă.

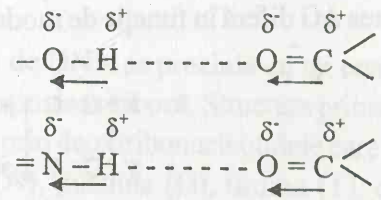
Legătura electrovalentă (ionică) se caracterizează prin acţiunea forţelor electrostatice exercitate între ioni cu sarcini lectrice opuse (anioni şi cationi).În cazul legăturii ionice - cu caracter heteropolar - configuraţia electronică stabilă se formează prin pierdere sau câştig de electroni.

Substanţele formate din molecule cu legături ionice sunt cristalizabile, au temperaturi de topire şi de fierbere mai ridicate. În stare lichidă, sau dizolvate, prezintă conductibilitate electrică.

Compuşii cu legături electrovalente sunt uşor ionizabili. Energia de legătură, comparativ cu legăturile covalente, este mai redusă.

C. Legătura de hidrogen. Legătura de hidrogen se realizează între un atom de H (cu deficit electronic) şi un alt atom cu densitate electronică mai mare (O sau N). Acest tip de legătură denumită şi "punte de hidrogen" se reprezintă prin linie punctată.

Legătura de hidrogen este o legătură slabă de tip electrostatic în care apar dipoli cu sarcini parţiale (negativă δ^- sau pozitivă δ^+).Astfel de legături pot fi realizate între dipolii:



Se remarcă faptul că legătura de hidrogen se stabileşte intermolecular, dar, în unele cazuri şi intramolecular.

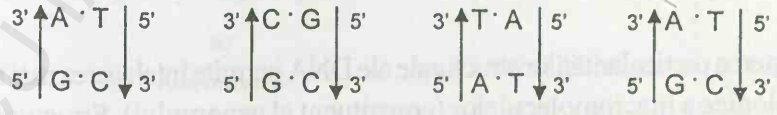
Legăturile de hidrogen sunt caracteristice unor macromolecule de importanţă majoră, cum ar fi: protidele (e.g. lanţurile peptidice) şi acizii nucleici (e.g. între nucleobazele complementare A-T, C-G din DNA) etc. Aceste legături asigură realizarea şi menţinerea structurii sterice a edificiilor macromoleculare.

D. Forţele de înstivuire. Forţele de înstivuire caracterizează "legăturile" dintre perechile de nucleobaze (baze azotate heterociclice) vicinale: adenină-timină (A-T) şi guanină-citozină (G-C) din macromolecula dublu helicală a acidului deoxiribonucleic (DNA).

Definite în diverse moduri (fr. empilement; engl. stacking), forţele de înstivuire apar în cursul biosintezei DNA şi contribuie la menţinerea stabilităţii sterice a dublului helix al acestei macromolecule poliheteronucleotidice. natura acestor forţe nu este pe deplin elucidată.

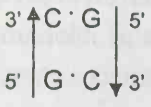
Nucleobazele prezente în DNA au momentele de dipol mari, din acest considerent sunt puţin solubile în apă şi au tendinţa de a forma agregate în care acestea se "înstivuiesc" aproape spontan. Pentru caracterizarea perechilor de nucleobaze vicinale, se utilizează expresia "perechi dimere". În literatura de specialitate nu s-a convenit asupra unei noţiuni care să caracterizeze această dispunere sterică.

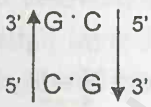
Se exemplifică în acest sens câteva perechi dimere (vicinale) de nucleobaze şi modul de notare uzuală:



BCU IAŞI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

În cazul înstivuirii perechilor de baze G-C (dimere) în B-DNA (după Boccara şi Verdiere-Sahuque, 1998), mărimea ΔG diferă în funcţie de modul de înstivuire, astfel:





ΔG = - 14 KCal/mol dimer ΔG = - 9,69 KCal/mol dimer

Superpozabilitatea perechilor de nucleobaze (numită în unele lucrări de specialitate "reacoperirea" bazelor) nu este posibilă datorită interacţiilor produse de diverşi substituenţi exociclici, e.g. gruparea aminică -NH_2, gruparea hidroxilică -OH, gruparea metilică -CH_3.Evident, situaţia dobândeşte complexitate în cazul nucleobazelor cu incidenţă redusă. Aceşti substituenţi exociclici aparţinând unei perechi de nucleobaze - în cazul înstivuirii - interacţionează cu nucleele purinic şi pirimidinic (care au caracter aromatic) ale perechii nucleobazelor vicinale.

3.5. ACIZII DEOXIRIBONUCLEICI

Din punct de vedere structural, acizii deoxiribonucleici sunt macromolecule formate din deoxiribonucleotide (dAMP, dGMP, dCMP, dTMP ş.a.) unite prin legături fosfodiesterice. Particularităţile structurale conferă acestui biopolimer proprietăţi fizico-chimice distinctive şi un rol biologic bine circumscris (Watson şi Crick, 1953; Chargaff şi Davidson, 1955-58; Ayad şi Blamire, 1972; Davidson, 1972; Popa şi Repanovici, 1991; Davidson şi Sittman, 1994).

Macromolecula de DNA înmagazinează în secvenţa nucleotidelor constituente informaţia genetică, atât la organismele acelulare (e.g. virusuri) cât şi la organismele celulare din regnurile vegetal şi animal (e.g. celule procariotice şi eucariotice).

3.5.1. STRUCTURA CHIMICĂ

Cunoaşterea particularităţilor structurale ale DNA permite înţelegerea mai riguroasă a activităţii biologice a macromoleculelor (constituent al genomului). Structura acizilor deoxiribonucleici poate fi descrisă la mai multe nivele de organizare. In acest fel se disting structurile: primară, secundară, terţiară şi cuaternară.

BCU IASI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

3.5.1.1. Structura primară

Macromolecula de DNA se prezintă ca un compus policondensat format din mononucleotide care conţin deoxiriboză. Structura primară rezidă din secvenţa unităţilor monomere reprezentate prin deoxiribonucleotidele care conţin patru baze caracteristice acestor acizi: adenina (A), guanina (G), timina (T), citozina (C) şi în unele cazuri deoxiribonucleotide cu baze metilate.Un fragment al structurii primare a DNA, sub forma unui tetramer, este redată în fig. 3-12.

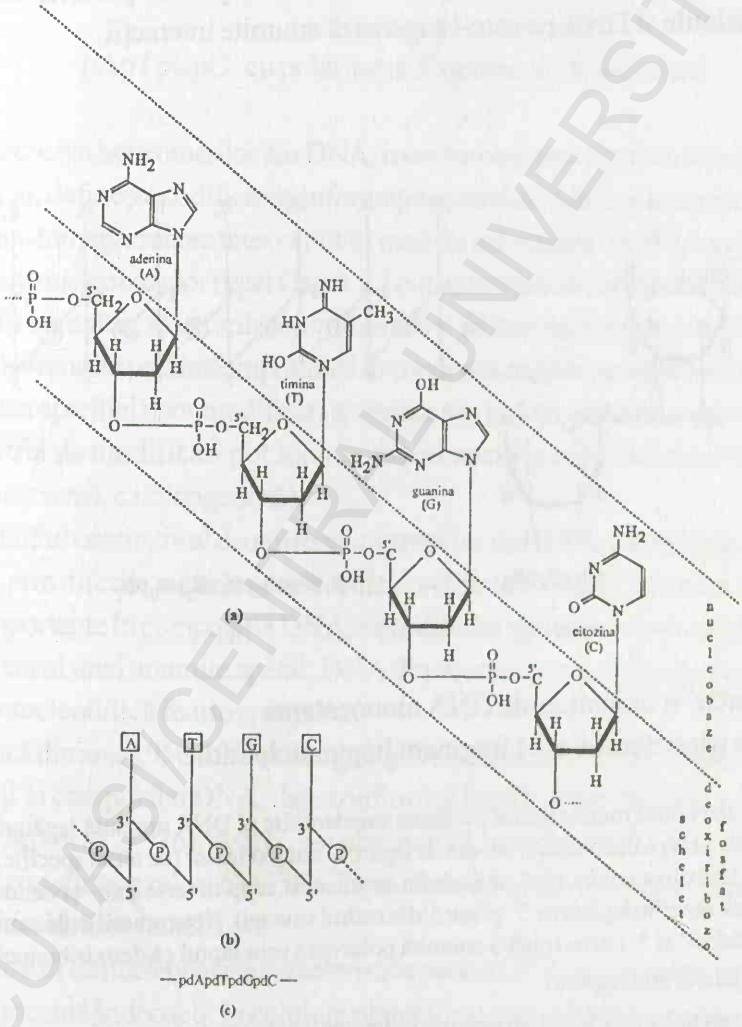


Fig. 3-12. Fragment al DNA monocatenar (moduri de prezentare)
a) formula unei catene tetraheterodeoxiribonucleotidice; b) prezentare schematică a catenei; c) prezentare literală (abreviată)

ECU MEDICINE LIBRARY UNIVERSITY

Legarea deoxiribonucleotidelor se face prin intermediul grupării fosfat. Aceasta esterifică deoxiriboza la C_5, al unui nucleotid, realizând apoi o a doua esterificare la C_3, al deoxiribozei nucleotidului vicinal.

Natura legăturii internucleotidice s-a dovedit deci a fi de tip fosfodiesteric, realizându-se la nivelul grupărilor hidroxilice ale deoxiribozelor vicinale (din secvențele nucleotidice). Decelarea acestei posibilități de legare s-a făcut prin incorporarea unor deoxiribonucleotid- 5'-fosfați marcați în molecule DNA.

Gruparea fosfat mai dispune de un hidroxil neesterificat, care, în stare nativă, poate protona - situație prezentată în fig. 3-13. Această ipoteză permite explicarea caracterului **polianionic** al DNA pe care-l sugerează anumite interacții.

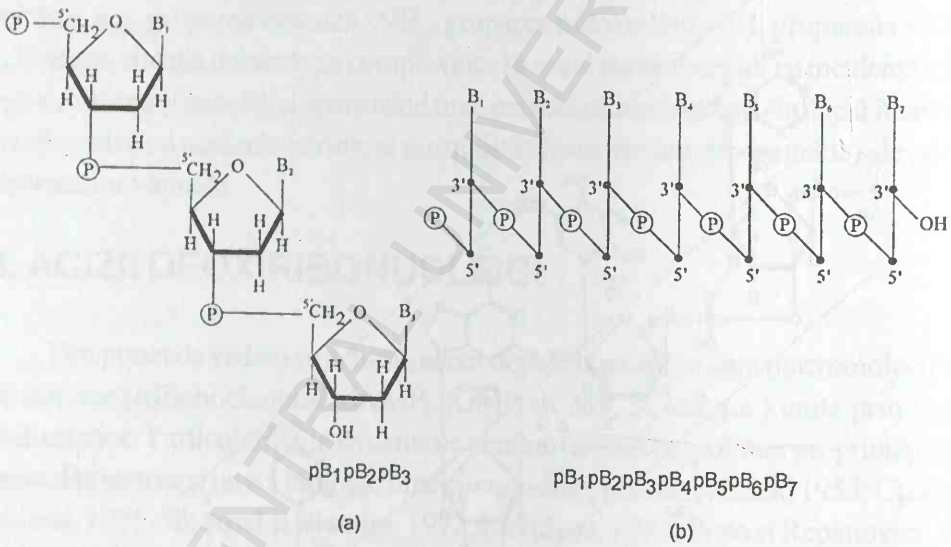


Fig. 3-13. Reprezentări schematice ale DNA monocatenar
a) fragment trinucleotidic, b) fragment heptanucleotidic

În ansamblul său lanțul monocatenar poliheteronucleotidic al DNA prezintă legături de tipul 3'-5'-.....-3'-5', realizate prin radicali fosfat. Modul de legare al nucleotidelor (de altfel specific şi pentru RNA) s-a stabilit prin hidroliza enzimatică, utilizându-se în acest scop diverse exo- şi endonucleaze (hidrolaze care scindează specific legăturile 5' şi/sau 3'din cadrul catenei). Heteromerii de la extremitățile catenei (formând capetele 3' şi 5') determină o anumită polaritate prin faptul că deoxiribonucleotidele terminale nu sunt angajate în alte legături.

Reprezentarea schematică a structurii primare se poate face şi prin menționarea deoxiribozei d (sau evidențierea pozițiilor C_3, şi C_5, ale acesteia), a grupărilor fosfat (P) şi a bazelor azotate B_1, B_2, B_3, ..., B_n (v. fig. 3-13). In astfel de reprezentări nu se

menționează C_1., care este legat de bază. Deoxiriboza se prezintă sub forma unui segment de dreaptă pe care se evidențiază legăturile difosforice ale grupării (P). La DNA heptamer se evidențiază extremitatea C_5, (fosforilată) și respectiv, C_3, (hidroxilată). Bazele, notate cu B_1, B_2,.....B_7, se inseră succesiv pe scheletul gluco-fosforic al DNA. In scrierea abreviată a unei anumite secvențe monocatenare se notează gruparea fosfat prin (P) și bazele azotate prin inițiale specifice (A,T, G, C), făcându-se și precizări asupra modului de legare la C_3, și C_5, denumită uneori "polaritate" a lanțului. Spre exemplu, în cazul fragmentului redat în fig. 3-13 se poate scrie:

pApTpGpC cu polaritatea 3'-terminal 5'-terminal

Secvența heteromerilor din DNA, recte succesiunea acestora în cadrul lanțului macromolecular, definește codificarea informației genetice. Mărimea impresionantă a acestui lanț permite înmagazinarea unei cantități mari de informație. In DNA grupările aminice și cetonice ale nucleobazelor (vezi Cap.3.2.) pot exista și sub forme tautomere distingându-se, așa cum s-a arătat, structurile amin-iminică și lactam-lactimică (ceto-enolică).

Tautomeria prezintă importanță în contextul relației structură-activitate, explicând posibilitatea apariției unor modificări spontane sau induse experimental în macromolecula DNA. Astfel de modificări pot induce uneori apariția unor structuri bioincompatibile (e.g.: mutageneză, carcinogeneză).

Studiul cantitativ al deoxiribonucleotidelor din DNA s-a realizat, după o prealabilă hidroliză, prin diferite metode analitice fizico-chimice. Astfel, s-a putut constata că există variații importante în compoziția DNA, de la diferite specii de plante și animale (Chargaff, 1950). In cazul unei anumite specii, DNA din diverse țesuturi și organe are o compoziție deoxiribonucleotidică foarte apropiată.

Incă din anii 1950-1955, Chargaff și Davidson au atras atenția asupra unei anumite regularități în compoziția DNA, date confirmate în anii următori (Sober, 1970; Davidson, 1972; Adams et al., 1976). Astfel, s-a observat că există o cvasiegalitate între proporțiile molare ale nucleobazelor A, G, C, T ș.a. Suma bazelor purinice este egală cu suma bazelor pirimidinice (tabel 3-4).

Alături de nucleobazele caracteristice pentru DNA, s-a mai decelat 5-metil-citozina (5-MC) prezentă îndeosebi în celulele plantelor și animalelor superioare. De asemenea, suma bazelor aminate (A și C) este aproximativ egală cu suma bazelor hidroxilate (G și T).

In mod curent compoziția DNA se poate evalua prin proporția molară a nucleobazelor (exprimată prin procente), prin rapoarte între grupe de nucleobaze (A/T,

Tabel 3-4. Proporţii molare ale nucleobatelor esenţiale din DNA.

Specificare		A	G	C	T	5-MC
Animale	Timus de bovine	28,2	21,5	21,2	27,8	1,3
	Spermă de bovine	28,7	22,2	20,7	27,2	1,3
	Măduvă de şobolan	28,6	21,4	20,4	28,4	1,1
Plante	Phaseolus species	29,7	20,6	14,9	29,6	5,2
	Zea mais	26,8	22,8	17,0	27,2	6,2
Bacterii	Escherichia coli	26,0	24,9	25,2	23,9	-
	Mb. Tuberculosis	15,1	34,9	35,4	14,6	-
	Drojdie	31,1	18,7	17,1	32,9	-
Virusuri	X 174	24,3	24,5	18,2	32,3	-
	T – 2	32,6	32,6	18,2	16,6	-
	T - 7	26,0	24,0	24,0	26,0	-

respectiv G/C) şi prin raportul unor sume ale nucleobazelor A+G/T+C. In tabelul 3-5 se prezintă date privind raporturile molare dintre nucleobaze luate separat şi sumate pe grupe.

Tabel 3-5. Raporturi molare ale nucleobazelor din DNA.

Specificare		A/T	G/C	(A+G) / (T+C)
Virusuri	Adenovirusuri	0,96	1,02	0,99
Bacterii	Escherichia coli	1,00	0,98	0,99
	B. subtilis	1,01	0,98	1,00
Plante	Arahide	1,00	0,98	0,99
Animale	Broască	1,00	0,99	0,99
	Embrion de găină	1,10	1,12	1,11
Om	Ficat	1,00	0,98	0,99

S-a constatat că nucleobazele purinice şi pirimidinice din compoziţia DNA de la o anumită specie, în condiţii morfofuncţionale normale, prezintă un cuantum constant, independent de factorii ecologici şi de vârstă. Pe de altă parte cuantumul DNA din genom (Sober, 1970; Kaplan şi Delpech, 1986) este mai mare la eucariote, în comparaţie cu procariotele.

In prezent se poate caracteriza DNA de la diferite specii prin valoarea raportului A+T/G+C (tabel 3-6). Acest raport este, în general: supraunitar la animale şi plante, are valoarea 1,00 la E. coli, iar la bacterii variază între 0,35-2,70.

Tabel 3-6. Raporturile molare ale unor sume de nucleobaze.

Specia	Raport (A + T) / (G + C)
Om	1,50
Oaie	1,36
Bou	1,30
Ursin	1,58
Germeni de grâu	1,20
Escherichia coli	1,00
Sarcina lutea	0,35
Alcalipenes faecalis	0,50
Clostridium perfringens	2,70

Datele prezentate, cu privire la structura primară a DNA, conduc la următoarele concluzii:

- compoziţia în nucleobaze a DNA este o caracteristică a organismului. Astfel, la modul general, se poate afirma că toate celulele somatice ale unui organism, la orice vârstă şi în toate circumstanţele fiziologice au un DNA cu aceeaşi compoziţie în baze;

- compoziţia în nucleobaze a DNA variază de la o specie la alta în regnurile animal şi vegetal.

Ca şi constituent al genomului, DNA relevă variaţii de la o specie la alta (specio-specificitate) atât în privinţa compoziţiei în baze, a secvenţei deoxiribonucleotidelor cât şi a cuantumului.

Una din problemele importante ale structurii primare la DNA a fost aceea de a determina ordinea secvenţei nucleobazelor deoarece scheletul pentozofosforic este constant. Problema unor astfel de determinări a fost soluţionată abia în anii precedenţi. Astfel s-a putut stabili compoziţia în baze a numeroase molecule de DNA. In prezent problema analizei secvenţiale pe catene de acizi nucleici, precum şi sinteza dirijată (cu secvenţe nucleotidice prestabilite) se realizează în mod curent în laboratoare specializate de Biologie moleculară.

In natură DNA monocatenar se află extrem de rar. O astfel de structură a fost stabilită, spre exemplu, la bacteriofagul ΦX 174 (Sinsheimer, 1959). Existenţa formei monocatenare a fost dedusă din faptul că sumele A+G şi T+C diferă şi din posibilitatea de a da reacţie pozitivă cu formaldehide (ceea ce denotă că grupările $-NH_2$ sunt libere,

neexistând legături de hidrogen). Macromolecula de DNA monocatenar, după Sinsheimer, poate coexista sub două forme distincte: lineară - biologic inactivă şi circulară - rezultată din precedenta prin formarea unei legături covalente între extremităţi, forma biologic activă (virulentă) a bacteriofagului (virusului bacterian).

3.5.1.2. Structura secundară

Elucidarea acestei structuri a fost posibilă prin coroborarea mai multor date fizico-chimice. Astfel, s-a avut în vedere similitudinea datelor analitice obţinute prin studiul preparatelor DNA de diverse proveniențe.

In toate situaţiile s-a confirmat: a) existenţa unei echivalenţe a cuantumului nucleobazelor A=T şi G=C; b) echivalenţa sumelor raţiilor molare ale nucleobazelor A+G=T+C; c) existenţa raportului unitar în cazul (A+G)/(T+C)=1. Această succesiune de axiome este uneori denumită "regulile Chargaff".

La aceste observaţii s-au adăugat informaţiile privind aspectele conformaţionale obţinute prin spectrele de difracţie a razelor X (Franklin şi Gossling, 1953; Wilkins et al., 1953) constatându-se că macromoleculele de DNA prezintă o structură spaţială ordonată. Astfel, difractometric, prin studii asupra sărurilor de litiu ale DNA, s-a stabilit existenţa unei structuri cu repetiţii la 3,4 nm, cu reflexii maxime la 0,34 nm (Sayre, 1975; Watson, 1980).

Pornind de la datele chimice şi fizico-chimice s-au emis diverse ipoteze asupra configurării spaţiale a DNA care poate avea catene: paranemicale (gr. para - alături; nema - fir) - cu dispunere vicinală liberă sau plectonemicală (gr. plecto - împletire, nema - fir) - cu dispunere torsionată, mai apropiată de rezultatele obţinute prin spectroscopia cu raze X.

Datele experimentale obţinute au condus la emiterea, de către Watson şi Crick (1953), a ipotezei cu privire la structura dublu catenară, helicoidală. Dublul helix al DNA (fig. 3-14) este constituit din două catene paralele de sens opus: scheletul pentozo-fosfat prezintă legături orientate 3' 5', respectiv, 5' 3'. Astfel, dublul helix - torsionat în jurul unei axe mediane (axa helicală) - se defineşte prin **"antiparalelismul"** catenelor.

Fiecare tur al helixului are lungimea de 3,4 nm şi este format din 10 perechi de deoxiribonucleotide, ceea ce face ca translaţia h (reprezentând distanţa dintre perechile vicinale de nucleobaze) să fie de 0,34 nm.

Catenele dublului helix realizează prin torsionare două scizuri sau şanţuri (fr.sillon; engl. growes) inegale ca dimensiuni: şanţul mic şi şanţul mare. In acest context se face remarca faptului că diferiţi compuşi care se combină cu DNA (e.g.: enzime, hormoni, ioni metalici, antibiotice ş.a.) se plasează pe unul sau altul din şanţuri.

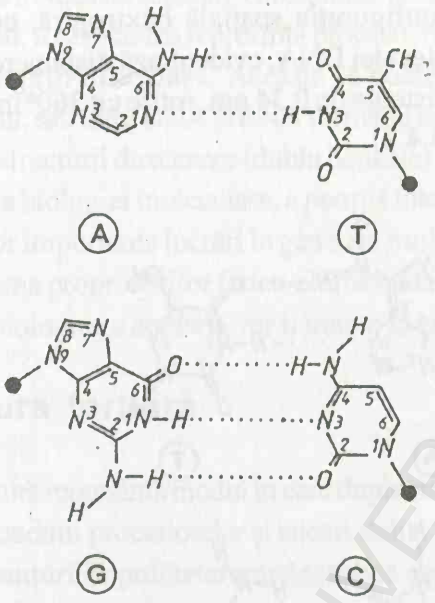


Fig. 3-14. Fragment din dublul helix al DNA (model Watson-Crick)

Catenele macromoleculare DNA dublu helix - se asociază între ele la nivelul nucleobazelor din deoxiribonucleotide. Aceste asocieri se realizează prin legături de hidrogen între bazele purinice şi pirimidinice. Legăturile se realizează între perechile de nucleobaze A-T (prin două legături de hidrogen) şi C-G (prin trei legături de hidrogen), asigurând astfel "**complementaritatea**" catenelor (v. fig. 3-14).

In ansamblul său, modul de legare al nucleobazelor, deoxiribozei şi grupării fosfat din deoxiribonucleotidele constituente ale macromoleculei DNA dublu helix, determină dispunerea complementară şi antiparalelă a catenelor. Legăturile de hidrogen sunt prezentate în accepţia modelului Watson-Crick (1953), iar numerotarea atomilor s-a făcut în conformitate cu recomandările din 1970 ale IUPAC - IUB (Comisia pentru Nomenclatura Biochimică).

Legăturile de hidrogen dintre perechile de baze A-T se pot realiza şi în alt mod, existând un model Hoogsteen (1963) în două variante posibile (fig. 3-15). Aceste moduri de legare nu sunt specifice DNA natural, dar pot fi întâlnite în poliheterodeoxiribonucleotidele sintetice şi, posibil, în unele structuri bioincompatibile (patologice).

In modelul clasic al DNA, elaborat de Watson şi Crick, catenele polihetero-nucleotidice dispuse plectonemic, prezintă o torsionare spre dreapta, realizând dublul

helix cooaxial **dextrogir**. Configuraţia spaţială dextrogiră, corespunzând tipului conformaţional B al macromoleculei DNA, evidenţiază dispunerea perechilor de baze adiacente (superpozabile) la distanţa de 0,34 nm, rotite cu 360° în cadrul unui helix cu diametrul de 2,0 nm. (v. Cap. 3.4.2).

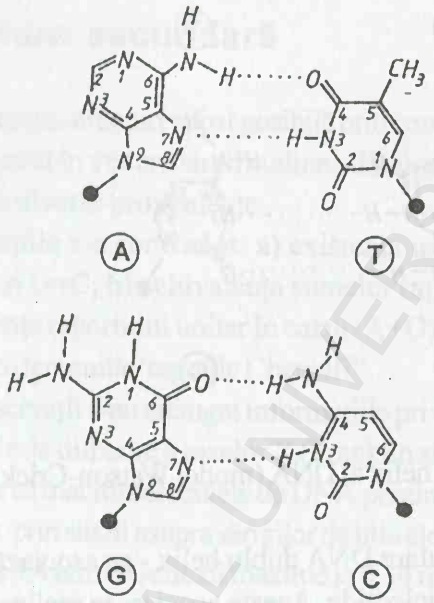


Fig. 3-15. Legăturile de hidrogen la perechile de baze A-T (model Hoogsten, 1963)

Investigaţiile fizico-chimice şi calculele mecanic-cuantice au deschis noi orizonturi în cunoaşterea tipurilor de DNA. Intre diversele tipuri există diferenţe conformaţionale marcate, caracterizate prin variaţia proprietăţilor topologice în stereostructura DNA. In acest context un interes aparte prezintă structurile dicatenare, helicale, cu dextro- şi senestrorotaţie.

Structura dicaternară a DNA prezintă o mare stabilitate fizico-chimică asigurată pe verticală de *legăturile fosfodiesterice intracatenare*, iar pe orizontală de *legăturile de hidrogen intercatenare* şi de *forţele de înstivuire* (fr. "empilement", engl. "stacking") a perechilor de baze adiacente din cadrul dublului helix (duplex). Astfel, ciclurile furanozice ale resturilor de deoxiriboză şi grupările fosfodiesterice constituie "scheletul extern" al dublului helix, în bazele azotate orientate spre interior şi dispuse pe "paliere" etajate constituie "trepte interne" în lungul axei helixului.

Catenele sau lanturile (fr. "brin", engl. "chain") dublului helix sunt menţinute de legături slabe astfel că separarea (disocierea) acestora a fost posibilă in vitro prin încălzire

sau prin tratare cu săruri. Această separare corespunde la ceea ce se numeste **denaturare** şi are caracter reversibil. Reasocierea reprezintă procesul reversibil denumit **renaturare** , care se poate realiza prin **hibridare**. Aceasta se poate efectua între DNA şi DNA formând homoduplexul, sau între DNA şi RNA formând heteroduplexul.

Descoperirea structurii dicatenare (dublu helicale) a DNA a marcat un important moment în dezvoltarea biologiei moleculare, a permis interpretarea datelor din genetica clasică şi iniţierea unor importante lucrări în genetica moleculară, biochimie, patologia biochmică etc. Problema proprietăţilor fizico-chimice ale macromoleculei DNA dublu helicale, a activităţii biologice a acesteia vor fi tratate în cadrul altor capitole.

3.5.1.3. Structura tertiară

Această structură reprezintă modul în care duplexul de DNA se dispune în spaţiu, aranjându-se în cromozomii procariotelor şi eucariotelor. Macromoleculele prezintă un aspect pliat. Plierea lanţurilor poliheteronucleotidice conferă macromoleculei forme compacte şi dimensiuni reduse. Adaptarea structurii terţiare de către DNA filiform dublu catenar, este determinată de necesitatea încadrării sale în dimensiunile reduse ale formaţiunilor nucleare din celule.

La *procariote* se întâlneşte o singură macromoleculă dicatenară de DNA, linear sau circular. Aceasta prezintă un aspect pliat, nu este legat de proteine şi constituie aşa-numitul **genofor**. Celulele procariotice conţin un singur cromozom format dintr-o singură macromoleculă de DNA dispusă în aşa-numita "zonă nucleară" (nu există înveliş perinuclear). Macromolecula are lungimea de cca. 1,2 nm şi este strâns spiralată.

La *eucariote* DNA prezintă o formă de organizare mai complexă - încă necunoscută în intimitatea sa - aflându-se aproape exclusiv (95%) în structurile cromozomiale din nucleul celular. In cazul celulelor eucariotice este prezentă învelişul perinuclear care delimitează nucleul cu un diametru aproximativ de 5-6 mm. Macromoleculele de DNA asociate cu proteine (îndeosebi histone) se constituie în aşa numitul "**aparat genetic**" celular. Nu se cunoaşte numărul macromoleculelor de DNA dintr-un cromozom, dar s-a remarcat o independenţă relativă a diferitelor segmente cromozomiale. Acest fapt pledează pentru posibilitatea existenţei mai multor macromolecule de DNA în cadrul unui cromozom. Heterogenitatea structurală a DNA nuclear este caracteristică, întâlnindu-se: secvenţe deoxiribonucleotidice scurte repetate de foarte multe ori, care constituie DNA - reiterativ cca. 30-40% şi secvenţe unice, reprezentând DNA - nereiterativ, cca. 60-70% (Sissoeff et al., 1976).

Includerea DNA în nucleu implică o considerabilă compactare spre a se putea

integra spaţiului "circumscris" de învelişul perinuclear. Compactarea nu se face la hazard, deoarece DNA trebuie să rămână accesibil proteinelor care reglează expresia şi duplicarea sa. Compactarea DNA poate fi considerată ca o expresie a structurii terţiare.

Există chiar un sistem ierarhic al compactării caracterizat prin două nivele structurale: **nucleosomul** (monosomul sau mononucleosomul) - reprezintă structura de bază universală a eucariotelor; **cromatina** - reprezintă nivelul superior corespunzător unei suprastructuri variabile în funcţie de tipul de celule şi statusul (citocinetica) acestora.

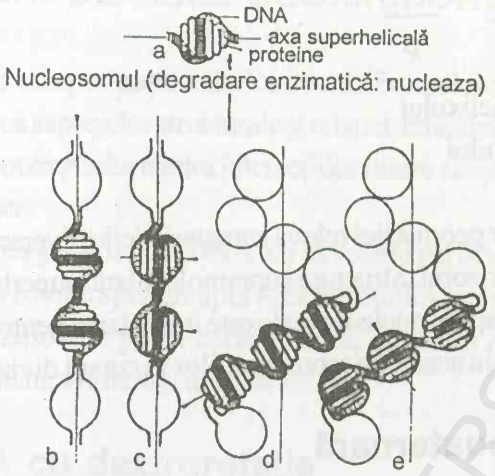
Studiul nucleosomului - interesând structura terţiară a DNA - s-a făcut cu ajutorul microscopiei electronice de înaltă rezoluţie pe preparatele obţinute prin degradarea enzimatică sau ultrasonarea cromatinei. Elaborarea modelelor structurale bazate pe astfel de investigaţii completate cu alte date fizico-chimice (obţinute prin diverse metode: difracţia razelor X; difracţia de neutroni; dicroismul circular ş.a.) au făcut obiectul a numeroase studii după anii '70.

Nucleosomul prezintă un aspect sferic cu diametrul de cca. 10 nm, fiind constituit din DNA (cu masa moleculară aproximativă 8.000 Da şi lungimea de aproximativ 40 nm) rulat suprahelical la exteriorul particulei, înconjurând produşii proteici (cu masa moleculară pe aproximativ 12.000Da) în cadrul cărora interacţiunile histone-histone sunt esenţiale. Parametrii superhelicităţii la DNA şi nucleosomi relevă compatibilitate la compresie pentru DNA de 40 nm până la 10 nm în cazul DNA rulat în superhelix (Houssier, 1977). In stare nativă nucleosomii - integraţi în cromatină - sunt interconectaţi prin segmente internucleosomale scurte de 40-60 perechi de nucleobaze dispuse într-un aranjament helicoidal mai mult sau mai puţin compact (Carpenter et al., 1976).

Mărimea nucleosomilor a fost evaluată şi în cadrul unor studii asupra apoptozei (moartea celulară programată) în cazul căreia s-a observat că endonucleaza produce clivajul moleculei de DNA la nivel internucleosomal. Cu acest prilej s-a observat că fragmentele de DNA rezultate au 180-200 pb şi corespund mărimii unui nucleosom - considerat ca unitate de bază a cromatinei (Wyllie et al., 1980)

Dispunerea macromoleculei de DNA în nucleosomi (considerat ca forme ale nivelului structural terţiar) şi în cromatină (evaluată ca nivel structural cuaternar) se prezintă în fig. 3-16.

Evaluarea structurilor secundare - corespunzătoare DNA dextrogir de tip B (notat B-DNA) şi terţiară - datorată aranjamentului superhelicoidal al DNA în nucleosomi s-a putut face prin investigaţii fizico-chimice diverse între care un important rol l-a avut dicroismul circular (Houssier, 1977; Gârban, 1982). In acest mod s-a ajuns la definirea unor parametri geometrici lineari (pasul şi diametrul) şi angulari (inclinaţia) - tabel 3-7.



Aranjamente polinucleosomale în cromatină

Fig. 3-16. Modele de aranjamente terţiare şi cuaternare ale cromatinei (după Houssier, 1977)

Se remarcă faptul că lipsa structurii suprahelicoidale este cotată ca o anulare a unghiului de înclinaţie (cazul structurii secundare).

Tabel 3-7. Parametrii geometrici ai structurilor secundare şi terţiare (date compilate de Houssier, 1977)

Nivele de structură	Parametrii geometrici			Referinţe bibliografice
	Pasul (p) (n)	Diametrul (d) (nm)	Înclinaţia (θ) (^{0})	
Secundară	3,4	2,0	0	Watson şi Crick (1953)
Terţiară	4,5	5,6	75°30'	Bram şi Ris (1971)
	12,0	10,0	89°00'	Pardon şi Wilkins (1972)
	5,3	13,0	82°30'	Hyde şi Walker (1975)
	4,5	7,4	79°00'	Pardon et al. (1975)

Determinarea unghiului de înclinaţie al superhelixului, notat uneori prin θ, se face cu ajutorul relaţiei:

BCU IAŞI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

$$\theta = \frac{\pi d}{p}$$

în care: d - diametrul superhelixului
p - pasul superhelixului

Valorile parametrilor geometrici relevă caracteristicile diverselor aranjamente în superhelixul prezent în nucleozomi. Structura supramoleculară (superhelicoidală) a DNA la eucariote în care apar formaţiuni nucleozomale este importantă pentru formarea fibrelor de cromatină în interfază şi din acestea a cromozomilor în cursul diviziunii celulare.

3.5.1.4. Structura cuaternară

In mod curent problema structurii cuaternare la DNA (elucidată parţial) este prezentată în tratatele de Biologie moleculară sau Biochimie. Avându-se în vedere faptul că această structură se defineşte mai pregnant în diversele faze citocinetice datele referitoare la cromatină sunt expuse predilect în tratatele de Biologie celulară şi Histologie.

Reconsiderând datele privind structura terţiară - definită prin aranjamentul superhelicoidal al nucleozomilor - s-au evaluat parametrii geometrici liniari şi angulari. In tabelul 3-8 se prezintă date privind structura cuaternară. Acest nivel structural caracterizează de fapt cromatina.

Tabel 3-8. Parametrii geometrici ai structurii cuaternare (date compilate de Houssier, 1977)

Parametrii geometrici			Referinţe bibliografice
Pasul (nm)	Diametrul (nm)	Înclinaţia (°)	
50,0	26,0	58°30'	Bram et al. (1975)
10,0	25,0	83°00'	Carpenter et al. (1976)

Iniţial denumirea de **cromatină** a fost dată de Flemming (1879), pentru substanţa nucleară care fixează puternic coloranţii bazici. Aceasta prezintă forme condensate observate în cursul mitozei pe care Flemming (1889) le-a denumit "**cromosomi**".

In accepţia cunoştinţelor actuale, se consideră că în nucleu DNA nu este niciodată solitar, ci se asociază cu proteine şi cu RNA constituind un ansamblu denumit cromatină (Kaplan şi Delpech, 1990).

3.5.2. GENURI DE ACIZI DEOXIRIBONUCLEICI

Înţelegerea importanţei acizilor deoxiribonucleici pentru biologia moleculară implică cunoaşterea aspectelor structurale şi relaţiei structură chimică - activitate biologică. Astfel de detalii pot explicita natura interacţiilor dintre aceşti biopolimeri şi diverşi agenţi chimici şi/sau fizici.

Prezentarea genurilor de DNA are în vedere particularităţile structurii secundare dublu-helicale cu rotatie spre dreapta (dextrorotaţie) sau spre stânga (senestrorotaţie). Tipurile conformaţionale pot fi caracterizate, în prima aproximaţie, prin parametrii stereochimici de natura liniară şi angulară.

3.5.2.1. DNA cu dextrorotatie

Investigaţiile fizico-chimice şi calculele mecanic-cuantice au deschis noi orientări în cunoaşterea *genurilor* de DNA cu dextrorotaţie notate prin A, B, C, D (denumite uneori ca "*familii*", "*clase*" sau "*tipuri*" de DNA). Intre aceste tipuri există diferenţe conformaţionale notabile, caracterizate prin variaţia proprietăţilor topologice în stereostructura DNA.

3.5.2.1.1. Particularităti structurale stereo-chimice

Conceptele de "conformaţie" şi "configuraţie" – cu care operează stereochimia – au sensuri circumscrise, neexistând însă delimitări riguroase.

Configuraţia defineşte aranjamentul spaţial al atomilor şi/sau grupelor de atomi, în jurul unei părţi disimetrice sau rigide a moleculei, în cazul cel mai simplu în jurul unui atom de carbon asimetric (Bedea şi Kerek, 1974).

Faptul că în cazul moleculelor cu cel puţin doi atomi de carbon asimetrici sunt posibile mai multe aranjamente în spaţiu, cauzate de rotaţii în jurul legăturilor din moleculă, a condus la acceptarea termenului de conformaţie (Haworth, 1929) sau de constelaţie (Ebel, 1930) - citaţi de Angelescu şi Cornea (1969).

Conformaţia evidenţiază un anumit aranjament geometric (steric) al atomilor unei molecule în urma rotaţiei limitate în jurul unei legături simple sau chiar a deformării unghiurilor de valenţă fără ruperea legăturilor covalente.

Deosebirea dintre noţiunile de configuraţie şi conformaţie rezidă, în principal, în modul de caracterizare a edificiului molecular, recte a numărului de coordonate folosite

BCU CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

în descrierea acestuia. Astfel, pentru definirea geometriei moleculare se utilizează drept coordonate interne: lungimi ale legăturilor, unghiuri de valenţă, unghiuri de torsiune. In definirea configuraţiei se utilizează primele două coordonate, iar în definirea conformaţiei se utilizează unghiurile de torsiune.

In cazul particular al DNA, complexitatea structurală a macromoleculei a impus necesitatea unor aprofundate studii pornind de la dublul helix coaxial. Pentru definirea genurilor A-DNA, B-DNA, C-DNA şi D-DNA se evaluează diferenţele conformaţionale caracterizate prin variaţia parametrilor liniari şi angulari.

In acest context se discută parametrii sterici dependenţi de:

- resturile de nucleotide (nucleotide reziduale) în edificiul macromolecular;
- perechile de nucleobaze (respectiv nucleotide) din dublul helix al macromoleculei.

A. Parametrii sterici ai nucleotidelor reziduale

Definirea genurilor de DNA implică, între altele, cunoaşterea diferenţelor conformaţionale în care intervin unghiurile de torsiune ale resturilor de deoxiribonucleotide din DNA (Arnott, 1978; Jack, 1979). Descrierea acestor unghiuri se face în raport cu ciclul furanozic al deoxiribozei.

Modul de notare al acestor *unghiuri de torsiune* (numite şi unghiuri *conformaţionale*) în cazul unui nucleotid oarecare este redat în figura 3-17.

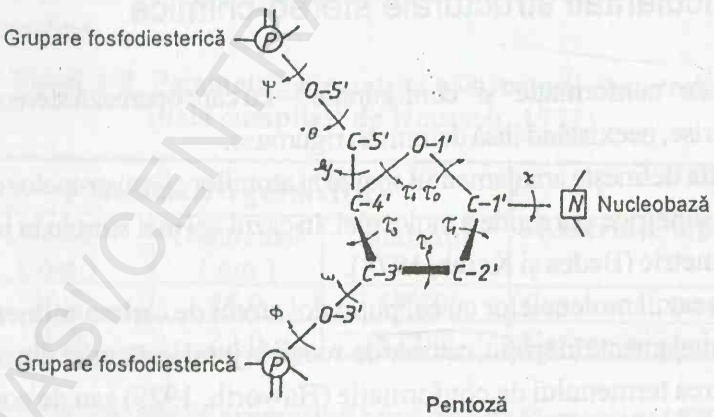


Fig. 3-17. Unghiuri conformaţionale caracteristice nucleotidelor

Se remarcă existenţa unghiurilor de torsiune intranucleotidice externe şi interne în raport cu deoxiriboza. În figură s-au reprezentat schematic doar legăturile cu nucleobaza şi grupările fosfodiesterice.

B.C.U. "M. EMINESCU" IAŞI

In mod curent se descriu şapte unghiuri de torsiune externe (exociclice) ale deoxiribozei: ψ, θ, ζ, τ, ω, ϕ, χ, care caracterizează deoxiribonucleotidul şi diferă la diversele tipuri de DNA. Baza azotată prezintă, de asemenea, o rotaţie liberă, dar mai restrânsă, în jurul legăturii unice dintre C_1, al pentozei şi N_9 purinic sau N_1 pirimidinic formând unghiurile conformaţionale.

Unghiurile de torsiune interne, caracteristice ciclului furanozic al deoxiribozei, se notează prin τ_0–τ_4. Acestea determină apariţia conformaţiilor endo- şi exo- ale deoxiribozei. Modelul Watson-Crick (1953) corespunde genului B-DNA, având deoxiriboza în forma conformaţională C-3'-exo sau C-2'-endo. Aceste forme prezintă similitudini (Arnott, 1978; Grunberg şi Weinstein, 1979; Dickerson, 1983).

Studiul structurii secundare s-a efectuat prin analiza de difracţie cu raze X, stabilindu-se unghiurile de torsiune intranucleotidice externe (Arnott, 1978; Garban, 1982). Date comparative privind variaţia acestor unghiuri de torsiune (conformaţionale), în raport cu tipurile de DNA se prezintă în tabelul 3-9.

Tabel 3-9. Unghiuri conformaţionale intranucleotidice la DNA

Tipul	Unghiuri conformaţionale (^{0})							Conformaţia deoxiribozei
	Ψ	θ	ξ	τ	ω	Φ	χ	
A-DNA	-85	-152	45	83	178	-47	86	C-3'-endo
B-SDNA	-46	-147	36	157	135	-96	143	C-2'-endo
C-DNA	-39	-160	37	157	161	-106	143	C-2'-endo
D-DNA	-62	-152	69	157	141	-101	144	C-3'-endo

Structura secundară a genului numit B-ADN este cea mai frecvent întâlnită în natură. Existenţa acestui tip este favorizată de polaritatea crescută a mediului şi de prezenţa ionilor externi.

Se exemplifică unele efecte ale cationilor. Astfel, umiditatea relativă de 75-92% şi/sau NaCl 3% determină apariţia genului B la fibrele de DNA (Cooper şi Hamilton, 1966). Cationii influenţează tranziţia tipurilor de DNA. Astfel, în cazul NaDNA apar genurile A, B şi C, iar în cazul LiDNA apar doar tipurile C şi B (Arnott, 1978).

B. Parametrii sterici ai perechilor de nucleobaze

Diferitele conformaţii ale macromoleculei DNA se caracterizează şi prin variaţia unor parametrii geometrici raportaţi la perechile de nucleobaze din nucleotidele dublului helix. In acest context sunt studiaţi parametrii liniari şi angulari (fig. 3-18) ai edificiului macromolecular (Hermann, 1976; Arnott, 1978; Jack, 1979).

Intre **parametrii liniari** s-au evaluat:

- translaţia (h) reprezentând intervalul dintre două perechi succesive (superpozabile) de nucleobaze;
- distanţe (d) dintre centrul de greutate al nucleobazelor şi axa dublului helix.

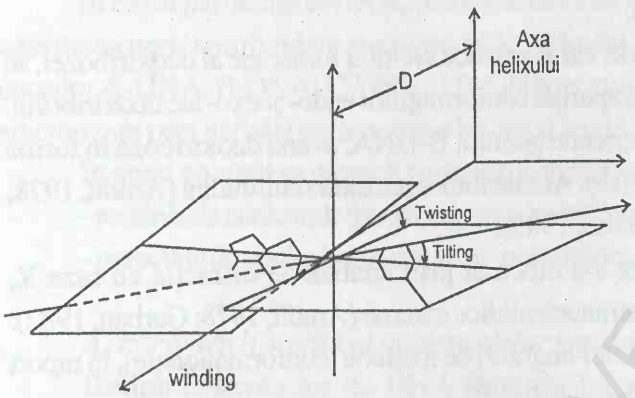


Fig. 3-18. Modificări conformaţionale la macromolecula DNA

Parametrii angulari vizează diversele unghiuri interne ale perechilor de nucleobaze:

- winding - unghiul de rotaţie al perechilor succesive (superpozabile) de nucleobaze din dublul helix;
- twisting - unghiul de înclinaţie al nucleobazelor vicinale în planul vertical;
- tilting - unghiul de înclinaţie al nucleobazelor vicinale în plan orizontal.

Prin determinări fizico-chimice şi prin calcule mecanic-cuantice s-au putut stabili valorile unora din parametrii liniari şi angulari discutaţi pentru diferite tipuri de DNA (tabel 3-10).

Tabel 3-10. Parametrii sterici ai DNA dublu helix.

Genuri de DNA	Parametrii lineari		Parametrii angulari (^{0})		
	translaţia (h) (nm)	distanţa (d) (A)	winding	twisting	tilting
A-DNA	0,256	4,25	32,7	-8,0	+20,0
B-DNA	0,337	-0,63	36,0	+5,0	-20,0
C-DNA	0,331	-2,13	38,6	-5,0	-6,0
D-DNA	0,303	- -	45,0	-	-

In definirea parametrilor angulari se uzitează de terminologia din limba engleză considerată consacrată pentru unele noţiuni de chimie-fizică (a se vedea similitudini cu spectroscopia în IR). Dintre parametrii menţionaţi se remarcă faptul că unghiul winding se referă la perechile sccesive (de pe "paliere" alăturate) de nucleobaze. Unghiurile tilting şi twisting se referă la nucleobazele vicinale din cadrul unei perechi (de tipul A-T şi G-C). Ultimele două tipuri de unghiuri pot fi pozitive sau negative în funcţie de sensul rotaţiei.

3.5.2.1.2. Elemente descriptive privind genurile de DNA

Genurile DNA cu dextrorotaţie s-au descris în grup datorită numeroaselor paralelisme privitoare la aspectele stereochimice. Totuşi se face şi o succintă descriere individuală. Dintre tipurile menţionate mai bine definite sunt A, B, C numite şi forme canonice (canonical forms). Genul D este mai puţin cunoscut.

Genul A-DNA are bazele înclinate cu un unghi de +20° în raport cu helixul. Aceasta face ca să se modifice translaţia astfel încât pasul helical să devină 2,56 nm cuprinzând un număr de 11 baze/tură. Acest tip apare în urma tranziţiei de la B-DNA care in vitro se realizează sub acţiunea unor cationi metalici sau a unor solvenţi organici, iar in vivo este produsă de proteine bazice. Un important rol au purinele (Pu) din lanţurile helicale. Dacă în dublul helix sunt purine suprapuse (Pu/ Pu) de tip G/G, macromolecula - într-un mediu slab polar - va evolua spre tipul A-DNA.

Genul B-DNA corespunde modelului clasic Watson-Crick şi este considerat ca formă nativă a DNA. Dispunerea celor 10 perechi de baze/tură se face perpendicular pe axul dublului helix. Lanţurile (catenele) helixului - aşa cum s-a arătat - sunt complementare şi antiparalele. Forţele care intervin în formarea şi menţinerea helixului (v.cap. 3.4.1.) conferă macromoleculei stabilitate mult crescută în raport cu alte genuri.

Genul C-DNA prezintă o uşoară înclinare a bazelor (-6°) faţă de axul duplexului. Aceasta antrenează şi modificări ale pasului helical, care devine 0,331 nm, incluzând un număr de 9,3 perechi de bază/tură. In vitro, în condiţiile scăderii polarităţii (prin adăugare de alcool la soluţii apoase), şi a scăderii umidităţii relative a fibrelor libere de săruri (e.g. la 66% caracteristică genului C, comparativ cu 92%, caracteristica genului B) se produce tranziţia spre genul C-DNA. Acest tip a fost întâlnit in vitro la unele genomuri virale. Se menţionează, de asemenea, apariţia acestei tranziţii la creşterea concentraţiei cationilor în mediu. In ceea ce priveşte genul C-DNA, se consideră că acesta prezintă o structură secundară mai apropiată de genul B-DNA.

Genul D-DNA este puţin cunoscut, probabil şi datorită dificultăţilor de investigare create de unghiul de rotaţie al bazelor (45°). Acest unghi, cel mai mare (comparativ cu restul tipurilor) condiţionează, între altele, şi translaţia făcând pasul helical să fie de 0,303 nm. Şi în cazul genului D-DNA este importantă existenţa bazelor purinice suprapuse (Pu/ Pu). Dacă acestea sunt A/A, macromolecula de DNA va realiza o tranziţie spre D-DNA.

In general, se poate afirma că genurile de DNA cu dextrorotaţie pot să apară condiţionat de natura nucleobazelor, polaritatea mediului, unele interacţiuni ionice etc.

Modificările conformaţionale ale edificiului macromolecular au la origine variaţii ale parametrilor sterici ai DNA dublu helix. Astfel de modificări se produc în cazul interacţiilor DNA cu diverşi compuşi chimici, cum ar fi: metalele, agenţii alchilanţi, hormonii steroizi etc. (Gârban et al., 1983; 1985).

Investigarea modificărilor conformaționale la macromolecula DNA se poate efectua, cu bune rezultate, prin metoda dicroismului circular. Cu ajutorul spectrelor de dicroism circular se poate decela schimbarea conformației de la genul B-DNA - corespunzător stării native a macromoleculei - şi apariția unor conformații aparținând genurilor A-DNA şi/sau C-DNA (mai frecvent întâlnite). Problema corelării spectrului de dicroism circular cu conformația macromoleculei de DNA a fost abordată de Tunis-Schneider şi Maestre (1970), care au dat o primă explicație a transformărilor conformaționale de la genurile (tipurile) de DNA.

Studiile referitoare la genurile de DNA şi modificările acestora suscită interes pentru faptul că pot contribui la explicitarea datelor rezultate din cercetări studiate în biologia moleculară, genetică, patologia biochimică, farmacologie ş.a.

3.5.2.2. DNA cu senestrorotatie

Aprofundarea investigațiilor asupra structurii DNA dublu helix a condus la observația că modelul dicatenar poate prezenta, în unele cazuri, o torsionare spre stânga. Acest model al macromoleculei, denumit DNA senestra, are grupările fosfodiesterice dispuse zigzagat. Intenția de-a releva această dispunere şi de-a evidenția deosebirile fundamentale față de genurile descrise: A, B, C, D (notate cu litere de la începutul alfabetului) a stat la originea alegerii literei Z (de la finele alfabetului) pentru desemnarea noului tip de DNA. Astfel, pentru macromolecule DNA cu senestrorotație s-a acreditat denumirea de DNA-Z (Rich, 1980). Această denumire "se referă" şi la aspectul zig-zagat al compusului.

Genul DNA-Z prezintă 6 perechi de nucleobaze per tură (360°), iar rotația privită în plan vertical se realizează în sens antiorar. Modificarea parametrilor sterici în cazul DNA-Z, relevă faptul că macromolecula dublu helicală prezintă o mare flexibilitate conformațională.

In figura 3-19 se redau modele ale DNA dublu helix, având în vedere reprezentarea clasică cu dextrorotație (genul B-DNA) şi conformația generată - grație flexibilității conformaționale a macromoleculei - prin senestrorotație (genul DNA-Z).

Deformarea şi alungirea dublului helix DNA-Z implică micşorarea diametrului, modificarea pasului helical la 6 perechi de deoxiribonucleotide (comparativ cu 10 perechi la tipurile cu dextrorotație) şi distorsia helixului (Rich et al., 1984; Repanovici, 1991). Studiul modificărilor genului B-DNA in vitro - efectuat pe DNA bogat în nucleobaze G-C - a sugerat posibilitatea separării catenelor în prezența $MgCl_2$. Aceasta este urmată

de reîmperecherea bazelor şi reorientarea acestora în deoxiribonucleotidele din dublul helix la DNA-Z reconstituit (Dickerson et al., 1982).

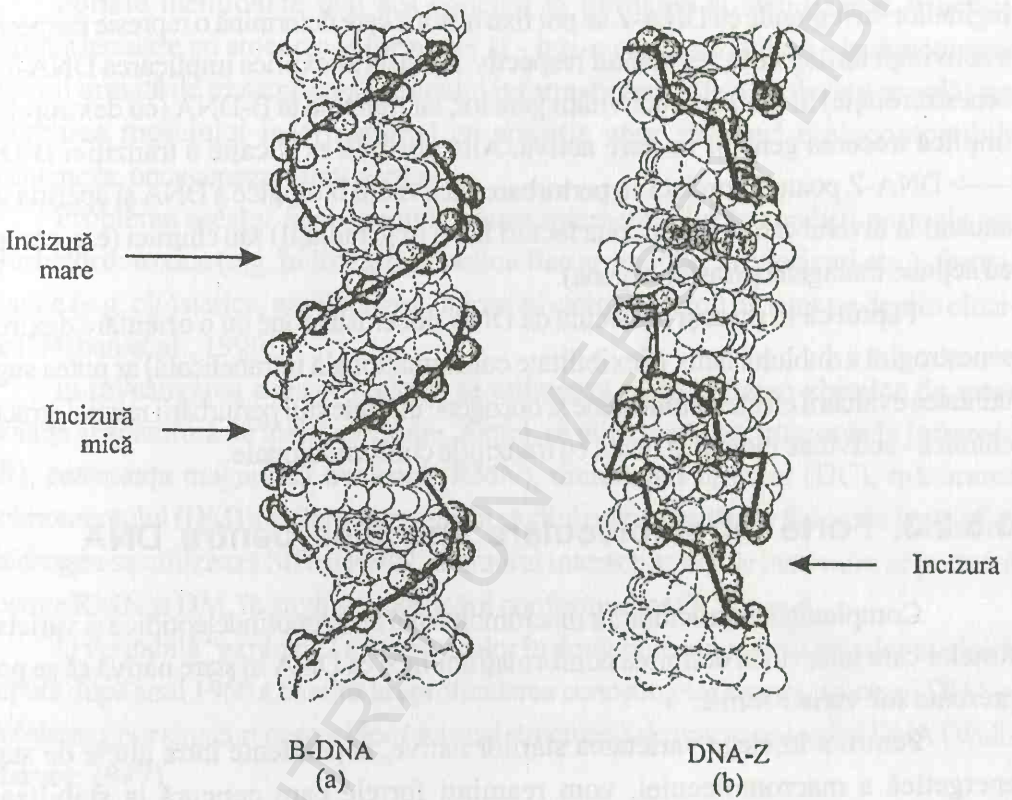


Fig.3-19. Prezentarea schematică a macromoleculului de DNA dublu helix (a) cu dextrorotaţie (B-DNA); (b) cu senestrorotaţie (DNA-Z)

Aspectele biologice, definite prin studii in vivo, sunt importante pentru considerentul că tranziţiile de la genul B-DNA la genul Z-DNA sunt compatibile cu mediul fiziologic. Genul DNA-Z a fost descris la cromozomii de Drosophila, chironomide şi chiar la cromozomii umani. Prin metilarea citozinei in vivo este posibilă tranziţia de la B-DNA la Z-DNA (modificarea vizează direct perechile de baze G-C). Astfel, în cazul inactivării unor gene, în afară de interacţia chimică, fenomenul este grevat şi de modificările sterice consecutive tranziţiei B-DNA ——> DNA-Z.

Astfel de tranziţii activate sub acţiunea grupărilor metil sau a sperminei determină scăderea cantităţii ionilor Mg^{2+} necesară separării catenelor în etapa iniţială a destabilizării

B-DNA. Stabilizarea tipului nou format DNA-Z se realizează prin proteine de legare specifice (cu ponderea moleculară de 70.000-150.000 Da).

Aprofundarea informaţiilor asupra DNA au arătat că este posibilă, pe acelaşi helix, coexistenţa genului DNA-Z în regiunile bogate în GC şi a genului B-DNA în restul regiunilor. In regiunile cu DNA-Z se pot fixa histone care determină o represie nespecifică a activităţii biologice în segmentul respectiv. Aceasta ar explica implicarea DNA-Z (cu senestrorotaţie) în inhibarea activităţii genelor, iar tranziţia la B-DNA (cu dextrorotaţie) implică trecerea genelor în stare activă. Altă posibilă explicaţie a tranziţiei B-DNA ——> DNA-Z poate fi corelată cu perturbarea activităţii biologice a DNA şi apariţia unor situsuri la nivelul cărora pot acţiona factori fizici (e.g. radiaţii) sau chimici (e.g. compuşi cu acţiune mutagenă şi/sau oncogena).

Faptul că în aceeaşi moleculă de DNA pot exista zone cu o orientare dextro- şi senestrogiră a dublului helix (flexibilitate conformaţională intrahelicală) ar putea sugera utilitatea evaluării efectelor mutagene şi oncogene în contextul perturbării relaţiei structură chimică - activitate biologică odată cu tranziţiile conformaţionale.

3.5.2.3. Forte intramoleculare specifice pentru DNA

Complexitatea structurală a macromoleculei heteropolinucleotidice şi varietatea forţelor care intervin în definirea conformaţiilor face ca DNA în stare nativă să se poată prezenta sub variate forme.

Pentru a înţelege varietatea stărilor native, dependente între altele de starea energetică a macromoleculei, vom reaminti forţele care concură la stabilizarea conformaţiilor DNA. La formarea şi stabilizarea edificiului macromoleculelor de natură poliheterodeoxiribonucleotidice caracteristic DNA concură:

- forţele electrostatice determinate de modificări ale tautomeriei nucleobazelor (formele ceto-enolice şi amin-iminice) şi de concentraţia cationilor din mediu;
- legăturile de hidrogen din perechile de nucleobaze (A-T şi G-C) au importanţă în stocarea şi transmiterea informaţiei prezentă în secvenţa deoxiribonucleotidelor constituente;
- forţele hidrofobe şi hidrofile datorate grupărilor fosfat orientate spre exteriorul helixului şi bazelor azotate orientate spre axul acestuia;
- forţele sau interacţiunile de înstivuire (stacking interactions) care asigură stivuirea perechilor de nucleobaze în interiorul dublului helix şi sunt dependente de starea electronilor şi de nucleele heterociclice;

- forţele van der Waals, care în cazul dublului helix al DNA se estimează că acţionează atât în plan vertical, însoţind interacţiunile de înstivuire, cât şi în plan orizontal însoţind legăturile de hidrogen.

Forţele menţionate mai sus concură la formarea şi stabilizarea structurii macromoleculare cu stocarea informaţiei şi - într-o etapă secundară - la denaturarea structurii urmată de transmiterea mesajului informaţional (într-o evoluţie normală) sau perturbarea mesajului informaţional cu apariţia unor structuri bioincompatibile (mutageneza, oncogeneza, teratogeneza).

Problema acestor forţe, complexitatea interacţiunilor în condiţii normale sau perturbatorii: toxice (e.g. hidrocarburi policiclice aromatice, azoderivaţi etc.); farmacologice (e.g. citostatice, azotiperitice, hormoni steroidici etc.) nu sunt pe deplin elucidate (Gârban et al., 1990).

In investigarea acestor legături se utilizează metode fizico-chimice de mare acurateţe şi aparatură de înaltă rezoluţie. Astfel, se utilizează spectroscopia în infraroşu (SIR), rezonanţa magnetică nucleară (RMN), dicroismul circular (DC), măsurarea dipolmomentului (DM) ş.a. Spre exemplu, în studiul particularităţilor fizice ale legăturilor de hidrogen se utilizează SIR şi RMN, în studiul interacţiunilor de înstivuire se pretează folosirea RMN şi DM, în studiul modificării conformerilor DC ş.a.m.d.

O veritabilă "explozie" a informaţiilor în domeniul cunoaşterii acizilor nucleici, începută după anul 1960 a condus la aprofundarea cunoştinţelor asupra structurii DNA şi la decelarea unor structuri nespecifice (unusual structures) ale macromoleculei DNA (Wells şi Harvey, 1987).

3.5.2.4. Dextrorotatia si senestrorotatia la DNA

Tipurile conformaţionale ale DNA caracterizate prin dextro- şi senestrorotaţie se impun atenţiei prin specificul relaţiei structură chimică-activitate biologică.

O primă remarcă referitoare la aceste tipuri evidenţiază descrierea şi caracterizarea parametrică (i.e. parametri sterici lineari şi angulari) prin raportare la structura secundară. Cercetări intreprinse de Arnott (1978), Jack (1979), Wang et al. (1979) şi Rich (1980) au relevat particularităţile diferenţelor structurale. Principalele date referitoare la aspectele structurale, compilate din literatura de specialitate, sunt redate în tabelul 3-11. Se prezintă o comparaţie între molecule cu dextrorotaţie din genul B-DNA ca formă stipică pentru structura nativă (in facto modelul Watson-Crick) şi genul DNA-Z, singurul reprezentant cu senestrorotaţie descris în literatura de specialitate.

Tabel 3-11. Particularităţi sructurale la DNA cu dextrorotaţie (B-DNA) şi cu senestrorotaţie (DNA-Z)

Genul B-DNA	Specificare	Genul DNA-Z
Structura secundară	Nivel structural al DNA-dc	Structură secundară
Dextrorotaţie	Sensul rotaţiei DNA-dc	Senestrorotaţie
3,4	Pasul helixului (nm)	4,5
0,34	Translaţia (nm) (distanţa între pb superpozabile)	0,37
10	Raportul pb/pas helical	6
20	Diametrul helixului (uzual dat în A)	18
C_2- endo	Unghiul de torsiune N-glicozidic la dGMP	C_3'
36	Unghiul winding (^{0})	-60

Ambele modele concordă în acceptarea unei răsuciri plectonemice a catenelor de DNA (i.e. DNAdc) în jurul unei axe comune a dublului helix. În acest helix coexistă catenele antiparalelele şi complementare.

Diferenţele conformaţionale între modelele cu dextro- şi senestrogire descrise, aşa cum s-a arătat, sunt explicitate de variaţii ale unor parametri sterici. Între aceşti parametri se remarcă distanţe, unghiuri şi adesea sunt luate în discuţie perechile de nucleobaze (notate convenţional pb – perechi de baze). În cadrul cercetărilor asupra structurii macromoleculei s-a remarcat că prin reacţii de alchilare (e.g. alchilarea guaninei cu mitomicină) este posibilă constituirea în cadrul moleculei de B-DNA a unor fragmente de DNA-Z. Această remarcă a condus la ideea că şi în condiţii naturale (ca urmare a unor procese de alchilare) este posibilă apariţia unor fragmente senestrogire în macromolecula cu orientare dextrogiră.

3.5.3. PARTICULARITATI TOPOLOGICE LA DNA

Sub aspect structural acizii nucleici se prezintă ca şi macromolecule mono- sau dicatenare, numite adesea şi lanţuri (catenle fiind asemuite unor lanţuri). Structura clasică acreditată prin modelul Watson-Crick (1953) este dicatenară şi helicală (dublu helix), tipul reprezentativ fiind B-DNA.

Din punct de vedere topologic (termen preluat în stereochimia acizilor nucleici) se descriu atât la DNA cât şi la RNA forme lineare, şi circulare care pot fi deschise sau închise precum şi o seamă de forme tranzitorii (e.g.: cu extremităţi coezive, suprahelical ş.a.).

Diversele aspecte topologice la DNA sunt prezentate în fig. 3-20. Se remarcă faptul că în cursul interacţiilor biochimice in vivo şi/sau in vitro topologia DNA, pentru aceeaşi moleculă, se poate schimba. In continuare se discută diversele aspecte topologice întâlnite la macromolecula de DNA.

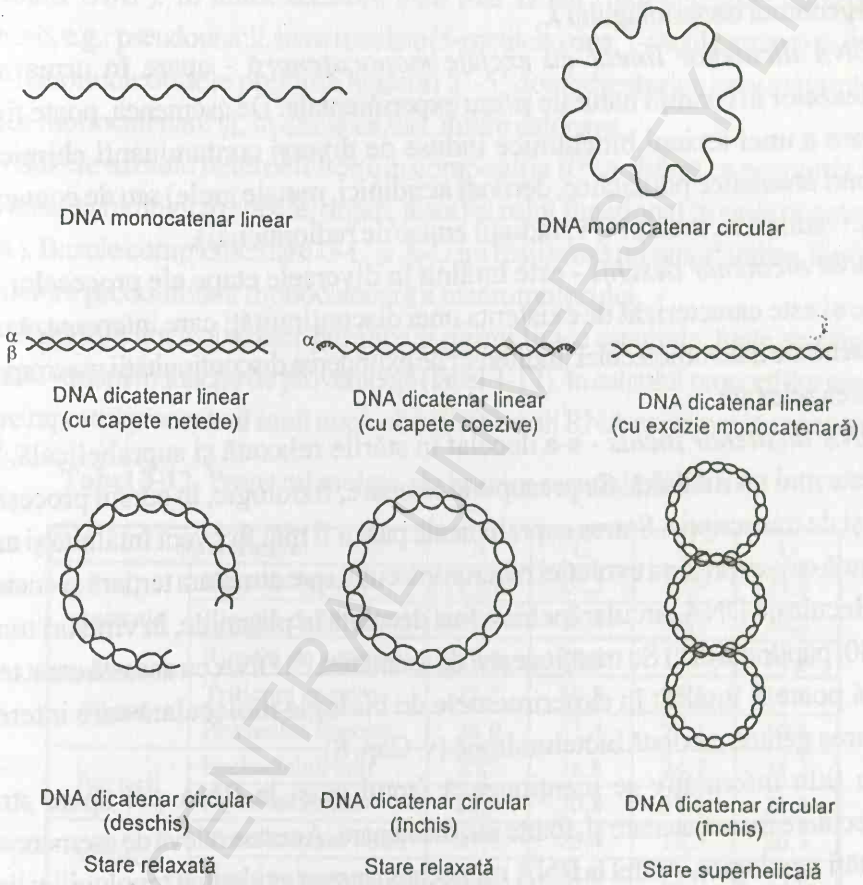


Fig. 3-20. Caracteristici topologice la macromoleculele de DNA

Macromolecula de DNA monocatenară, întâlnită în puţine cazuri (exemplul clasic în acest sens este DNA al bacteriofagului Φ X 174) poate prezenta topologie lineară sau circulară.

În cazul macromoleculei de DNA dicatenar (structura caracteristică a DNA) topologia poate evidenţia forme lineare, circulare, cu capete coezive etc.

BCU IAŞI/CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

DNA dicatenar linear - se poate întâlni în cazul genurilor A-DNA, B-DNA, C-DNA fiind influenţat de cuantumul apei din mediul de reacţie.

DNA dicatenar linear cu capete coezive - se formează în cursul intervenţiilor experimentale specifice biotehnologiei DNA recombinant. Se poate întâlni la DNA plasmidal şi la fragmente de DNA cromosomal (v. Cap. 4). în condiţii naturale a fost decelat în genomul bacteriofagului λ.

DNA dicatenar linear cu excizie monocatenară - apare în urma acţiunii endonucleazelor în condiţii naturale şi/sau experimentale. De asemenea, poate fi o etapă precursoare a unei leziuni biochimice induse de diverşi contaminanţi chimici (e.g.: hidrocarburi aromatice policiclice, derivaţi acridinici, metale grele) sau de contaminanţi fizici (e.g.: radiaţii X, radiaţii UV, radiaţii emise de radionuclizi).

DNA dicatenar deschis - este întâlnit în diversele etape ale proceselor ana- şi catabolice şi este caracterizat de existenţa unei discontinuităţi care interesează una sau ambele catene ale macromoleculei. Indiferent de extinderea discontinuităţii macromolecula este în starea relaxată.

DNA dicatenar închis - s-a decelat în stările relaxată şi suprahelicală. Starea relaxată este mai rar întâlnită. Se presupune că apare, fiziologic, în cursul proceselor de replicaţie şi de transcripţie. Starea suprahelicală pare a fi mai frecvent întâlnită şi ar putea fi considerată ca o expresie a evoluţiei macromoleculei spre structura terţiară şi cuaternară. Macromolecula de DNA circular închis a fost decelată în plasmide, în virusuri tumorale (e.g.: SV 40, papiloma etc.) Se menţionează de asemenea că DNA cu această caracteristică topologică poate fi întâlnit în experimentele de biologie moleculară care interesează recombinarea genică mediată biotehnologic (v. Cap. 8).

Cu titlu informativ se menţionează faptul că şi la RNA pot apare structuri macromoleculare monocatenare şi, foarte rar, dicatenare. Acestea relevă de asemenea unele particularităţi topologice. Astfel la RNA monocatenar s-au evidenţiat topologiile: linear la VMT); circulară (la virusul encefalitei murine); pliată (la bacteriofagul R-17). De asemenea s-a evidenţiat RNA dublu catenar linear (la Reovirus).

In general topologia în cazul virusurilor este dependentă de tipul de virus, iar în cazul procariotelor şi eucariotelor este depedentă de activitatea biologică (explicitate prin relaţia structură chimică-activitate biologică), de statusul condiţiilor experimentale (v.cazul tehnologiei DNA recombinant) sau de leziunile moleculare (molecular lesions) induse de factori mutageni şi/sau oncogeni de natură fizică, chimică sau biologică (explicitate în patologia biochimică).

3.6. ACIZII RIBONUCLEICI

Acizii ribonucleici sunt compuşi macromoleculari formaţi din monomeri de tip ribonucleotidic. Principalele ribonucleotide constituente sunt rAMP, rGMP, rCHP, rUMP (sau simplu UMP). In afara acestora s-au mai izolat ribonucleotide care conţin alte nucleobaze, e.g.: pseudouracil, baze metilate (5-metilcitozina, 1-metilguanina) şi chiar timina.

Ribonucleotidele prezintă legături 3'-5'-fosfodiesterice care asigură formarea lanţurilor monocatenare şi, în unele cazuri, dublu catenare.

Bazele azotate heterociclice din compoziţia RNA diferă ca proporţie în funcţie de proveniența biologică (specie, organ, ţesut) şi rolul funcţional în sinteza proteică (tipul de RNA). Bazele complementare G-C şi A-U nu realizează un raport unitar, fapt explicabil prin structura predominant monocatenară a macromoleculei.

Proporţia nucleobazelor purinice şi pirimidinice esenţiale, luate separat, prezintă importante variaţii în funcţie de proveniență (tabel 3-12). In calculul proporţiilor molare se are în vedere raportul procentual moli nucleobază/100 moli RNA exprimat în procente.

Tabel 3-12. Proporţii molare ale bazelor esenţiale din RNA

Specificare		A	G	C	U
Animale	Ficat de bovine	17,1	27,3	33,9	21,7
	Rinichi de bovine	19,7	26,7	33,4	20,2
	Rinichi de şobolani	19,4	29,5	37,0	20,4
Plante	Triticum species	25,2	30,8	25,4	18,6
	Phaseolus species	24,9	31,4	24,1	19,6
Bacterii	Escherichia coli	25,3	28,8	24,7	21,2
	Mycobacterium	20,9	30,8	27,1	21,3
Virusuri	Virus mozaic tutun	29,8	25,4	18,5	26,3
	Virus poliomielită	28,6	24,0	22,0	25,4

Evaluarea proporţiilor molare ale diferitelor nucleobaze prezente în tRNA a făcut obiectul a numeroase investigaţii. Astfel s-a constatat că există diferenţe notabile în funcţie de proveniența tRNA (tabel 3-13).

Datele analitice compilate de Sober (1970) şi Davidson (1972) - tabelele 3-12 şi 3-13, relevă varietatea de compoziţie a bazelor din RNA care conferă macromoleculelor caracterul heteropolinucleotidic.

Estimarea cantitativă a proporţiei nucleotidelor constituente se face prin hidroliză urmată de analize fizico-chimice (Duchesne, 1973). O importanţă aparte prezintă analiza

Tabel 3-13. Proporţii molare ale bazelor esenţiale din RNA.

Sursa şi tipul de RNA	A	G	C	U	Ψ	Baze metilate
Escherichia coli, mRNA	25,1	27,1	24,1	23,7	-	-
Escherichia coli, tRNA	20,3	32,1	28,9	15,0	2,1	1,6
Escherichia coli, rRNA	25,2	31,5	21,6	21,7	-	-
Drojdie, tRNA	19,4	26,6	25,1	20,1	4,6	3,1
Ficat iepure, tRNA	16,6	31,1	27,8	15,9	4,3	3,5

secvenţei prin care se defineşte poziţia nucleotidelor în cadrul lanţului. Analiza secvenţei vizează determinarea ribonucleotidelor terminale şi succesiv a secvenţei intracatenare.

3.6.1. STRUCTURA CHIMICĂ

In marea majoritate a cazurilor, RNA prezintă o structură monocatenară, existând însă şi structuri bicatenare rezultate prin plierea lanţului poliheteronucleotidic. In cadrul unei descrieri generale se pot distinge două categorii de RNA diferite structural şi funcţional: RNA-viral - constituind substratul ereditar al ribovirusurilor şi RNA-celular - format din molecule diferite care decodifică şi vehiculează informaţia în cadrul biosintezei proteice. În principal, se disting trei tipuri de RNA celular denumite: mesager (mRNA); de transfer (tRNA); ribosomal (rRNA). Acestea diferă sub raportul structurii chimice şi activităţii biologice. Prin cercetări mai recente s-au decelat şi alte tipuri. Asupra acestor probleme se va reveni. Şi în cazul acizilor ribonucleici se disting mai multe nivele structurale. In mod curent se discută existenţa, predilectă, a nivelelor: 1) primar; 2) secundar; 3) terţiar.

3.6.1.1. Structura primară

Natura legăturii internucleotidice s-a stabilit prin analiza produşilor de hidroliză alcalină ai RNA. Astfel s-a conchis că, în cele mai multe cazuri legătura fosfodiesterică din lanţul monocatenar se realizează la C_3, şi C_5, ai ribozei, din merii ribonucleotidici (fig. 3-21).

Prima determinare completă a structurii primare a unui acid ribonucleic s-a făcut asupra RNA de transfer (tRNA) al alaninei izolat de la levuri (Holley et al., 1965). La tRNA al alaninei au fost decelaţi 77 de aminoacizi.

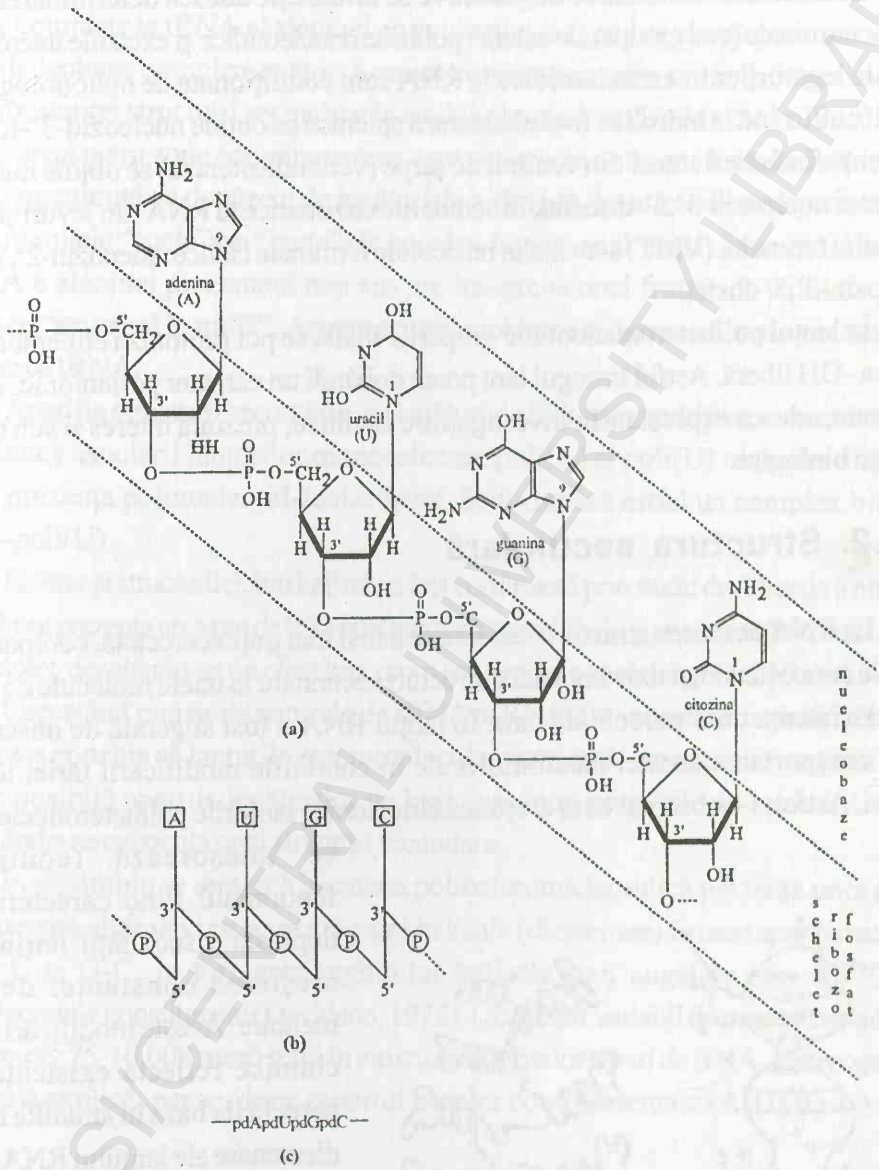


Fig. 3-21. Fragment al RNA monocatenar (moduri de reprezentare)
(a) formula unei catene tetraheteroribonucleotidice; (b) prezentarea schematică a catenei;(c) prezentarea literală abreviată)

In afara legăturii de tip –($C_{3'}$)–O–P–O–($C_{5'}$)– (cea mai caracteristică) s-au putut identifica şi legături fosfodiesterice dintre $C_{2'}$ şi $C_{5'}$ ai ribonucleotidelor din catenă.

BCU "ASICE" CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

In scindările enzimatice degradative se urmăreşte adesea determinarea naturii grupelor terminale (end groups) ale catenei poliheteronucleotidice şi exciziile intercatenare. Exciziile legăturilor internucleotidice la RNA sunt condiţionate de metodologie. Spre exemplu, utilizând la hidroliză fosfodiesteraza splenică se obţine nucleozid-3'-fosfat, iar în prezenţa fosfodiesterazei din veninul de şarpe (venondiesteraza) se obţine nucleozid-5'-fosfat şi nucleozid-3',5'-difosfat. In scindările enzimatice la RNA din levuri şi virusul mozaicului tutunului (VMT) s-au izolat nucleotide terminale ciclice: adenozin-2',3'-fosfat şi guanozin-2',3'-fosfat.

În lanţul poliheteronucleotidic grupările fosfat se pot protoniza eliberând H^+ din gruparea -OH liberă. Astfel întregul lanţ poate dobândi un caracter polianionic. Această proprietate, adesea exploatată în investigaţiile analitice, prezintă interes şi sub raportul activităţii biologice.

3.6.1.2. Structura secundară

La RNA definirea structurii secundare a fost mai puţin cercetată, comparativ cu DNA. Se cunoaşte totuşi existenţa unor structuri secundare la unele molecule de tRNA.

Existenţa unor perechi de baze în lanţul RNA a fost sugerată de observaţiile privind comportarea acestei macromolecule în condiţiile modificării tăriei ionice a mediului. Astfel, s-a observat că la creşterea tăriei ionice lanţurile poliheteronucleotidice se micşorează (contractă), fenomenul fiind caracterizat de depresia viscozităţii intrinseci şi creşterea constantei de sedimentare. Aceste modificări fizico-chimice reflectă existenţa unor perechi de baze în anumite regiuni dicatenare ale lanţului RNA.

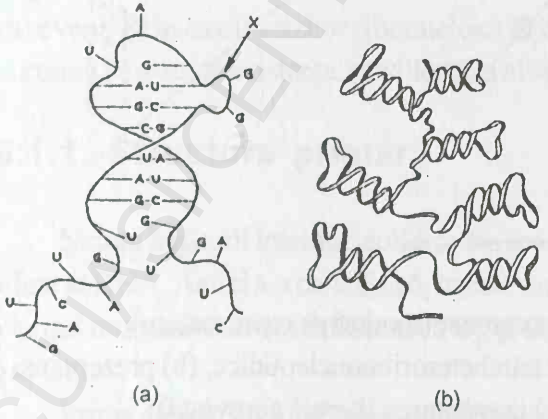


Fig. 3-22. Modele ale structurii secundare la macromolecula de RNA: a) după Spirin (1963); b) după Fresco (1963)

Structuri secundare, caracteristice RNA, în care se redă complementaritatea perechilor de nucleobaze au fost imaginate de Spirin (1963) şi de Fresco (1963) prezentate în fig. 3-22.

Cercetările întreprinse în anii următori care au condus la determinarea structurii primare complete la tRNA al alaninei au evidențiat și faptul că există patru zone în care există nucleobaze complementare. Această constatare a adus primele dovezi eclatante asupra existenței structurii secundare la acidul ribonucleic (Holley et al., 1965). Astfel, s-au remarcat patru zone complementare care generează o structură secundară denumită "rigidă" menținută de douăzeci de legături de hidrogen. Între zonele complementare se află așa numitele "bucle"sau "brațe" (fr. boucles, brases; engl. arms). În acest fel molecula de tRNA a alaninei prezentată mai sus are imaginea unei frunze de trifoi de unde și numele de "structură în treflă". Asupra acestei probleme se va reveni, cu unele detalieri la prezentarea tRNA.

Apariția structurii secundare, cu legături de hidrogen specifice, este atestată și de posibilitatea asocierii lanțurilor monocatenare poli(A) și poli(U) obținute din ATP și UTP în prezența polinucleotid-fosforilazei. Se formează astfel un complex bicatenar poli(A)–poli(U).

Existența structurii dublu helicale a fost confirmată prin studii de difracție a razelor X, relevându-se prezența unui pas de 0,34 nm (asemănător cu DNA) și prin cercetări spectroscopice în ultraviolet, decelându-se un efect hipocrom (cu depresia absorbanței la 260 nm).

Cercetând preparate naturale de rRNA și RNA din virusul mozaicului tutunului (VMT), s-a conchis că lanțurile macromoleculare prezintă - pe anumite porțiuni - plieri care fac posibilă apariția legăturilor de hidrogen între perechile de baze A-U și G-C confirmându-se existența unei structuri secundare.

In ansamblu se remarcă la catena poliheteronucleotidică prezența unor regiuni monocatenare alternând cu scurte regiuni helicale (dicatenare) în care apar perechile de baze A-U și G-C. In formarea regiunilor helicale sunt angajate cca. 40-70% din ribonucleotidele constituente (Davidson, 1972). Un număr variabil de monoribonucleotide (aproximativ 75-10.000 meri) intră în structura diferitelor tipuri de RNA. Heterogenitatea structurală explică, per se, de ce raportul bazelor complementare (A-U)/(G-C) nu este unitar.

3.6.1.3. Structura tertiară

Existența unei structuri terțiare la RNA a fost sesizată prin cercetarea preparatelor cristaline de tRNA prin metoda difracției razelor X. Astfel, s-a ajuns la o reprezentare simplificată a acestei structuri - fig. 3-23. In 1974 Rich și Klug au încercat să elucideze unele aspecte ale structurii tridimensionale a moleculei de tRNA.

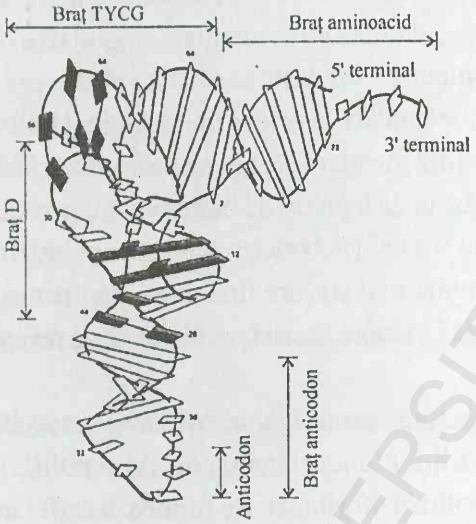


Fig. 3-23. Structura terţiară a macromoleculei RNA (Darnell et al., 1986)

S-a arătat că această structură este relativ compactă datorită gradului ridicat de împerechere a bazelor. Aceasta conferă rigiditate macromoleculei şi un aspect asemănător cu **"forma literei L"**. Molecula conţine două segmente dublu helicale cu cca. 10 perechi de baze.

Structura descrisă prezintă o primă regiune extremă, aşa numitul **"braţ pentru aminoacizi"** cu capetele 5` terminal, respectiv 3` terminal care are triada de nucleobaze CCA.

La secunda extremă a RNA cu "forma de litera L" se află **"braţul pentru anticodon"** care include trei nucleobaze complementare în raport cu nucleobazele speciei de tRNA şi care definesc anticodonul. La acestea se leagă anticodonul vehiculat de mRNA.

Se descriu şi alte grupuri de nucleobaze neîmperecheate, aşa numitele **bucle** sau specifice:

- braţul TyCG - denumit astfel după nucleobazele constituente T (timidina); Y (pseudouracil); C (citozina); G (guanina);
- braţul extra - care conţine un număr variabil de nucleobaze;
- braţul UdiH - denumit astfel pentru considerentul că un din nucleobaze este dihidrouracilul

Evident, tRNA descris pentru definirea structurii terţiare, prezintă diferenţieri structurale în funcţie de aminoacidul sintetizat, e.g.: Ala Phe pentru care există specii moleculare distincte, i.e. $tRNA^{Ala}$, $tRNA^{Phe}$. Aspecte mai detailate vor fi prezentate în continuare.

PCU CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

3.6.2. TIPURI DE ACIZI RIBONUCLEICI

Structura RNA - după cum s-a descris mai sus - este în general monocatenară cu posibilitatea de pliere şi formare a unor regiuni dicatenare la nivelul cărora apar legăturile de hidrogen dintre nucleobazele complementare. Această diversitate structurală va impune şi unele particularităţi ale activităţii biologice. Se poate astfel afirma că RNA relevă o mare heterogenitate structurală care influenţează relaţia structură chimică - activitate biologică.

Acizii ribonucleici constituie materialul genetic la virusurile bacteriilor, plantelor şi animalelor. La virusurile plantelor se întâlneşte doar RNA, iar la virusurile animalelor şi bacteriilor (bacteriofagi) se află RNA sau DNA. Virusuri care conţin în exclusivitate RNA, se întâlnesc la plante (virusul mozaicului tutunului), animale (viruşii miocarditei murine şi mieloblastozei aviare) şi la om (virusurile gripei, a poliomielitei). In bacteriofagii MS2 care infectează E.coli şi 7S - care infectează Pseudomonas aeruginosa se află, de asemenea, doar RNA.

In celulele pro- şi eucariotice se întâlnesc în principal, trei tipuri (clase) de RNA: mesager (mRNA), de transfer (tRNA) şi ribosomal (rRNA). La fiecare tip de RNA pot fi întâlnite mai multe specii moleculare. O prezentare sinoptică a tipurilor de RNA se face în tabelul 3-14.

Tabel 3-14. Principalele tipuri de acizi ribonucleici - date sinoptice

Tipuri de RNA	Specii de RNA (aprox.)	Constante Sedimentare (S)	Masă moleculară 10^6	Număr nucleotide	Compoziţia în baze	Rata (%) (din RNA total)
mRN	10^2 (10^3)	6-25	0,025 - 1,000	75 - 3,000	A, U, G, C	2 - 10
tRNA	60	4	0,023 - 0,030	75 - 90	A, U, G, C derivaţi metilaţi tiolaţi	10 - 20
rRNA	3	5	0,035	100	A, U, G, C derivaţi, metilaţi	75 - 85
		16 (18)	0,550	1,500		
		23 (28)	1,100	3,100		

De asemenea, diversele tipuri de RNA se deosebesc prin masele moleculare şi constantele de sedimentare (c.s.) exprimate în unităţi Svedberg (S). Varietăţile structural-funcţionale ale acestora sunt numeroase, fapt atestat de datele compilate din literatura de specialitate. Astfel, rRNA există în cel puţin trei forme, tRNA în cca. 60 forme, iar mRNA poate revela sute (chiar mii) de forme.

BCU IAŞI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

În afara acestor trei tipuri bine cunoscute s-a mai decelat un tip cu distribuţie mai restrânsă şi masa mai mică, aşa numitul RNA nuclea mic (scurt). Acesta se notează prin snRNA (small nuclear RNA)

Multitudinea de specii moleculare existente la unele tipuri (clase) de RNA se corelează cu specificul activităţii biologice.

3.6.2.1. RNA mesager

Acest RNA denumit *mesager* (mRNA) sau de *informaţie* (iRNA), este sintetizat în nucleu. Numele acestuia reflectă rolul pe care îl are în procesul de transcripţie prin preluarea şi vehicularea informaţiei genetice de la macromolecula de DNA cromosomal în cursul sintezei proteice.

O cantitate redusă de mRNA este sintetizată şi în mitocondrii, activitatea acestuia se poate corela cu DNA mitocondrial, deci de natură extracromosomală.

In compoziţia mRNA s-au decelat doar baze azotate tipice (A, U, G, C), cu remarca faptului că predomină doar două: A şi U (peste 55%). Sub raport structural mRNA relevă o conformaţie monocatenară lineară. Secvenţa bazelor azotate din mRNA reflectă pe aceea din DNA transcris. De altfel, formarea hibrizilor mRNA-DNA reflectă faptul că există complementaritatea bazelor din mRNA cu acelea din DNA templat.

Prin studiile efectuate de Jacob şi Monod (1961) s-a postulat existenţa distinctă a mRNA căruia i s-au atribuit proprietăţi specifice:

- se pot asocia temporar ribosomilor (în general sistemului poliribosomal) pentru a putea asigura sinteza proteinelor;
- prezintă o mare heterogenitate condiţionat de faptul că masa moleculară a acestora (25.000-1.000.000 Da) trebuie să reflecte varietatea maselor moleculare a proteinelor la a căror sinteză participă;
- dată fiind marea diversitate structurală a speciilor moleculare de mRNA cu mase moleculare diferite, se explică şi existenţa unor constante de sedimentare cu mărimi variate cuprinse între 6-25 S;
- compoziţia în nucleobaze trebuie să reflecte, în parte (exceptând U), pe aceea a DNA-situaţie care atestă copierea unui mesaj genetic (al unui cistron sau grup de cistroni). În acest mod devine, la rândul său purtător al mesajului genetic;
- din punctul de vedere al activităţii biologice are un turnover mult diferit: de la câteva minute la câteva ore. Astfel, spre exemplu, la celulele procariotice (i.e.

BCU IASI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

microorganisme) unde activitatea biologică impune o rapidă modificare a compoziției mediului, durata de semiviață este de ordinul minutelor. La celulele eucariotice (e.g. celule animale) durata de semiviață este de ordinul orelor.

In cursul biosintezei mRNA, desfăşurată în prezența RNA polimerazei-DNA dependente, se realizează o secvență ribonucleotidică complementară DNA matrice. Studiul structural al mRNA comportă dificultăți din cauza turn-overului ridicat, marcat prin biosinteza şi biodegradarea rapidă cu un timp de înjumătățire redus (e.g.: 25 minute pentru microorganisme la temp. 25°C). Turnoverul ridicat este condiționat de durata ciclului de reproducere celulară.

La finele transcripției mRNA trece în citoplasmă şi apoi la ribosomi unde îndeplineşte rolul de matriță pentru dispunerea secvențială a aminoacizilor în procesul de biosinteză a proteinelor.

In celulă, proporția mRNA este redusă (cca.5% din totalul RNA celular). Masa moleculară variază în limite destul de largi (de ordinul 10^3). Această largă scară de mărime caracteristică pentru mRNA se poate explica prin faptul că genele (recte DNA) pe care le transcrie diferă mult prin lungime.

Din lanțul monocatenar al mRNA se validează succesiv trei ribonucleotide (corespunzător mărimii unui codon) pentru a participa cu aminoacizii la biosinteza lanțului proteic. După participare la biosinteza proteinelor mRNA se detaşează de complexul polisomal şi este supus biodegradării de enzima denumită RN-ază.

3.6.2.2. RNA de transfer

Acizii ribonucleici de *transfer* (tRNA) sau *solubili* (sRNA) sunt molecule cu un număr relativ redus de heteromeri ribonucleotidici. Numele derivă de la faptul că funcționează ca "transportori" specifici ai moleculelor de aminoacizi în cursul biosintezei proteinelor, ca şi de faptul că sunt solubili în soluție de NaCl (comparativ cu rRNA care precipită).

In tRNA alături de nucleobazele caracteristice ribonucleotidelor constituente se află nucleobaze metilate, tiolate ş.a. Nucleobazele azotate cu incidență redusă, în cazul tRNA pot reprezenta cca. 10% din total.

De asemenea, în compoziția diferitelor specii de tRNA s-au decelat nucleotide nespecifice cum ar fi acizii pseudouridilic, tiouridilic şi ribotimidilic. (Ts'o, 1974). Procesele de alchilare şi tiolare se presupune că reprezintă atribute specio-specifice.

Complexitatea modificărilor - pornind de la organismele monocelulare spre cele pluricelulare - este pusă în legătură cu evoluţia filogenetică. Structura macromoleculei (care include cca. 75-90 nucleotide) evidenţiază în ansamblul său domenii lineare şi domenii parţial dublu helicale. Speciile moleculare aparţinând tRNA au o pondere moleculară mai redusă, cca 25.000 şi o constantă de sedimentare 4S cuantumul tRNA este de cca. 15% din totalul RNA celular.

Descoperirea tRNA a făcut posibilă explicarea mecanismului de transfer al aminoacizilor din citoplasmă spre polizomi asigurând astfel biosinteza proteinelor. Aminoacizii, în număr de peste 20, sunt legaţi şi transportaţi de diferite specii de tRNA.

Macromolecula de tRNA a servit la elucidarea particularităţilor structurii secundare. Conformaţia cea mai plauzibilă este aceea de "structură în treflă" amintită cu prilejul prezentării structurii secundare. Studiată de Holley et al. (1965), această structură a evidenţiat prezenţa a patru zone complementare (în care există 20 de legături de hidrogen între nucleobazele vicinale), a trei bucle şi a unei regiuni terminale (fig. 3-24).

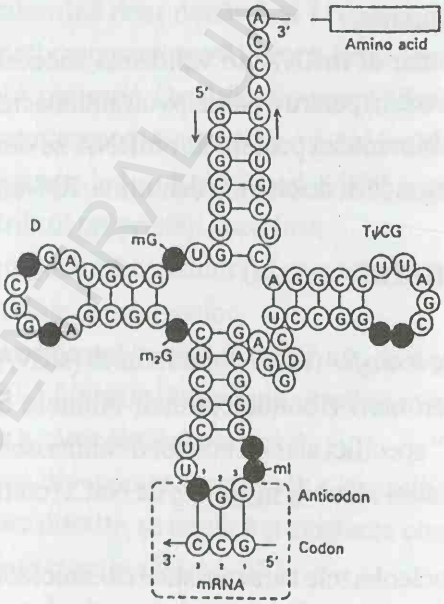


Fig. 3-24. Configuraţia macromoleculei $tRNA^{A}$ izolat de la levuri (Darnell et al., 1986)

Macromolecula descrisă de autori este tRNA al alaninei izolat de la levuri şi desemnat prin notaţia $tRNA^{Ala}$. Zonele complementare se disting: (1) între nucleotida a

cincea de la extremitatea 3`-terminală şi nucleotida primă de la extremitatea 5` - terminală; (2) lângă bucla TyCG (cu conţinut de acizi ribotimidilic, pseudouridilic, ribocitidilic şi riboguanozinic); (3) alăturat buclei care conţine dihidrouracil UdiH, respectiv acidul dihidrouridilic; (4) la închiderea buclei "extra" cu un număr variabil de nucleotide. Bucla "extra" denumită şi "bucla anticodon" pentru considerentul că la extremitatea ecestei zone se află anticodonul constituit din trei ribonucleotide specifice pentru fiecare aminoacid.

În zonele lipsite de legături de hidrogen apar ribonucleotide obişnuite sau metilate.

Conformaţia descrisă, s-a constatat ulterior, nu poate fi planară. Astfel, cercetându-se printr-o tehnică de difracţie cu raze X s-a conchis că modelul treflei prezintă două replieri deasupra planului şi două sub acesta, realizând o structură în forma literei L.

Structura terţiară a tRNA a fost acreditată datorită funcţiilor mai complexe ale acestei molecule şi existenţei a două stări conformaţionale reversibile deosebite prin activitatea biologică, precum şi a unor proprietăţi fizico-chimice. Unele aspecte ale structurii terţiare au fost expuse, în subcapitolul precedent. In cadrul structurii terţiare a tRNA se prezintă structuri spaţiale helicoidale evidenţiindu-se diverse bucle (braţe) formate din diverse zone ale aceleaşi catene poliheteronucleotidice. Pe una din bucle apare şi **anticodonul (nodocul)**. Problema anticodonului a fost adusă în discuţie odată cu ipoteza adaptorului (Crick, 1966). In accepţia acesteia aminoacidul în formare se leagă de un triribonucleotid complementar ca structură cu codonul din mRNA. Tripletul de ribonucleotide din molecula adaptorului, recte tRNA, formează legături de hidrogen cu unul din codonii mRNA. Regiunea în cauză a moleculei tRNA a fost denumită anticodon sau nodoc. Aceasta este dispusă în regiunea centrală a treflei tRNA.

Complementaritatea codon-anticodon diferă în funcţie de aminoacid. Se exemplifică în acest context:

- la alanină molecula de $tRNA^{Ala}$ relevă complementaritatea GCC-CGI; la serină tRNASer evidenţiază complementaritatea UCC-AGI;
- la serină $tRNA^{Ser}$ evidenţiază complementaritatea UCC-AGI;
- la fenilalanină $tRNA^{Phe}$ există UCC-AAG.

Astfel, pentru fiecare aminoacid există o comple- mentaritate diferită. In cazul serinei, argininei şi leucinei există doi codoni. Numărul total al codonilor este 64. Detaliile referitoare la tipurile de codoni interesează sinteza proteinelor.

In celulele mamiferelor sunt prezente cca. 80 specii moleculare de tRNA purtătoare ale anticodonilor care servesc la recunoaşterea mesajului conţinut în mRNA. Aminoacizii activaţi în citoplasmă sunt transferaţi de tRNA spre polisom la nivelul căruia are loc biosinteza proteinelor.

3.6.2.3. RNA ribosomal

Acidul ribonucleic *ribosomal* (rRNA) a fost izolat din ribosomii citoplasmatici (numiţi şi "granulaţiile lui Palade"), în care cuantumul acestuia reprezintă 75-85% din totalul RNA celular. Această variaţie mare este dependentă de sursa materialului biologic.

Structurile ribosomale sunt formate din mici particule ribonucleoproteinice cu diametrul de 10-15 μm, care conţin rRNA şi proteine cu masă moleculară mică. Ribosomul este format din două subunităţi acolite cu constante de sedimentare (S_{20w}) diferite în funcţie de provenienţă, e.g.: celulele procariotice (bacteriene) au S_{20w} 70 S, iar celulele eucariotice au S_{20w} 80 S.

Ribosomii *celulelor procariotice* - cu constanta de sedimentare 70S pot disocia în două subunităţi cu S_{20w} 50 S respectiv, 30 S. Subunitatea 50 S conţine două specii moleculare de rRNA cu ponderea moleculară de cca $1,2.10^6$ Da (S_{20w} 23-28 S), respectiv, 30.000-36.000 Da (S_{20w} 5 S) şi aproximativ 30 proteine diferite. Subunitatea 30 S conţine un rRNA cu ponderea moleculară în jur de 50.000-550.000 Da (S_{20w} 16-18 S) şi cca. 20 proteine diferite (v. tabel 3-14). Secvenţa nucleotidelor şi gradul de polimerizare la cele trei specii de rRNA diferă, fiind dependentă de specificul activităţii metabolice celulare. Detaliile structură-activitate nu sunt însă pe deplin elucidate.

Ribosomii *celulelor eucariotice*, care au S20w de 80 S pot, la rândul lor pot să se disocieze în subunităţi de 60 S şi 50 S. Prima subunitate de 60 S formează specii moleculare de rRNA cu S_{20w} 5 S, 7 S şi 28 S, iar subunitatea de 50 S va forma o singură specie de rRNA cu S_{20w} 18 S.

Conformaţia rRNA diferă în funcţie de constantele fizico-chimice ale mediului. Astfel, lanţul monocatenar dezordonat poate prezenta domenii lineare, helicale, retroplieri sau se poate compacta. Spre exemplu, temperatura influenţează mult conformaţia, realizându-se tranziţi în cadrul formelor helix-ghem (helix - coil): la temperatura camerei şi concentraţia moderată apar regiuni helicale (cca. 40-60%), iar la temperaturi crescute şi concentraţii mici apar forme de ghem.

Indiferent de specie, *în rRNA conţinutul de guanină şi citozină este mai ridicat*. Astfel, suma G+C este crescută în raport cu suma A+U, ceea ce determină o variaţie în limite destul de largi a raportului (A+U) / (G+C) cuprins între 0,50-0,74. Existenţa unui raport mai ridicat determină în rRNA creşterea regiunilor moleculare cu structură secundară helicală în raport cu structura lineară.

Rolul rRNA nu este pe deplin elucidat. Acesta reprezintă scheletul structural al ribozomilor, pe care se inseră proteinele ribozomale. Se supozează că diversele

componente ribozomale sunt implicate în modificările conformaționale specifice procesului de biosinteză a proteinelor.

3.6.2.4. RNA nuclear scurt

În tratatele clasice de Biochimie și Biologie moleculară se amintesc trei tipuri de RNA: mRNA, tRNA, rRNA. După anii `80, în tratatele de specialitate s-au mai inclus și alte tipuri de RNA, remarcabile prin structura chimică și activitatea biologică.

Întrea cestea se menționează un tip de RNA izolat din nucleu care conține 100-200 nucleotide bogate în uracil (U). Se cunosc 7 subtipuri diferite nominalizate uzual prin U_1, U_2,...U_7.

Datorită faptului că prezintă o catenă ribonucleotidică relativ scurtă este denumit adesea și "RNA nuclear mic" sau "RNA nuclear scurt". Abrevierea convențională se face prin **snRNA (small nuclear RNA)**. ACest tip de RNA este asociat proteinelor formând așa numitele ribonucleoproteide nucleare scurte.

Sub raportul activității biologice se consideră că acest RNA joacă un important rol în procesul de maturare și formare a mRNA biologic activ.

3.6.2.5. Conformatii macromoleculare la RNA

Tipurile de acizi ribonucleici diferă prin secvența ribonucleotidelor și prin conformația macromoleculară. Sinteza moleculelor are loc pe anumite regiuni specifice din DNA. Confirmarea acestui fapt s-a făcut prin obținerea unor hibrizi moleculari complementari.

La procariote biosinteza RNA se realizează în prezența RNA polimerazei-DNA dependentă (transcriptaza). Există o RNA polimerază unică cu 5 lanțuri polipeptidice care catalizează simtezele mRNA, tRNA și rRNA.

În cazul eucariotelor biosinteza diverselor tipuri de RNA specifici implică prezența RNA polimerazelor formate din 9-11 lanțuri polipeptidice, cu ponderea moleculară de cca $0,5.10^6$ Da. Astfel, mRNA este sintetizat sub forma unui precursor numit *RNA nuclear heterogen*, notat uzual **hnRNA**. Datele referitoare la acest precursor nu sunt edificatoare asupra structurii chimice și activității biologice propriu-zise.

În discutarea aspectelor referitoare la structura chimică și activitate biologică a acizilor nucleici se impune și relevarea rolului enzimelor. În cazul particular al RNA și a diversificării conformaționale a tipurilor formate în cursul biosintezei, un rol fundamental au RNA-polimerazele.

La eucariote se cunosc, îndeosebi, trei RNA-polimeraze distincte prin localizare şi prin activitatea biologică:

- *polimeraza I* sau *A* - de origine nucleară - concură la biosinteza rRNA cu constantele de sedimentare 28 S, 18 S, 5,8 S;
- *polimeraza II* sau *B* - de origine cromatiniană - aceasta asigură biosinteza mRNA;
- *polimeraza III* sau *C* - de origine cromatiniană - participă la biosinteza tRNA cu constante de sedimentare 4 S şi 5 S, precum şi la biosinteza smRNA.

Activitatea biologică a RNA polimerazelor se realizează prin fixarea pe DNA la o anumită distanţă în amonte de zona de iniţiere a biosintezei RNA. Fixarea se face pe o secvenţă a DNA denumită promotor.

Biosinteza, evident, este condiţionată de prezenţa amestecului ribonucleotidelor trifosfatate: rATP, rUTP (sau UTP), rGTP şi rCTP. După policondensare şi eliminarea molecilelor de difosfat se formează macromolecule poliheteroribonucleotidice în care există rAMP, rUMP (sau UMP), rGMP, rCMP.

Macromoleculele de RNA sintetizate, diferite prin secvenţa ribonucleotidelor şi prin conformaţie - asigură "transcrierea" mesajului informaţional din secvenţa deoxiribonucleotidelor constituente ale DNA. Complexitatea procesului şi specificul relaţiei structură chimică-activitate biologică sunt atestate şi de formarea unor hibrizi de tipul DNA-RNA ca forme tranzitorii.

În continuare, mesajul informaţional este vehiculat prin "traducere" în cursul biosintezei proteice, realizându-se o anumită secvenţă (genetic programată) a aminoacizilor din macromoleculele protidice nou formate.

BCU IASI/CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

4. ACIZII NUCLEICI IN BIOLOGIA MOLECULARA MODERNA

4.1. CONSIDERAȚII GENERALE

În biochimie şi biologia moleculară au fost acreditate noi concepte privind materia vie acelulară (i.e. virusuri) şi celulară (i.e.organisme procariote şi eucariote), precum şi la utilizarea unor metode specifice de investigare. Sub raport metodologic, în studiul materiei vii, s-a remarcat trecerea treptată de la pleiada tehnicilor microscopiei (fotonice şi electronice) spre metode chimice şi fizico-chimice (instrumentale), remarcabile prin acurateţe şi caracterul neinvaziv. Rezultatele obţinute au permis deplasarea frontierelor cunoaşterii umane şi realizarea unor impresionante progrese vizând diverse aspecte fundamentale şi aplicative (Sengbusch, 1979; Cantor şi Schimmel, 1980; Alberts et al, 1983; Darnell et al., 1986).

Marea majoritate a rezultatelor obţinute în domeniul biologiei moleculare sunt tributare studiilor efectuate asupra acizilor nucleici în ultimele cinci decenii. Nu este lipsită de importanţă remarca faptului că progresele s-au datorat stringentelor "impuse" atât sub raport **biomedical** cât şi sub raport **biotehnologic** (Alberts et al., 1983; Emery, 1984; Darnell et al, 1986; Kaplan şi Delpech, 1990; Gârban 1992; Davidson şi Sittman, 1994).

Deşi asocierea acestor direcţii de abordare ar putea fi considerata divergentă, la o privire mai atentă, "focalizată" pe problematica biologiei moleculare - apelând la metode biochimice şi chiar biofizice - constatăm că noile frontiere ale cunoaşterii aparent se depărtează de la "medical" la "tehnologic", însă cu certitudine se apropie la nivel biologic.

Investigarea acizilor nucleici - abordată prin metode specifice biologiei moleculare - a stat la baza a numeroase studii cu caracter fundamental şi aplicativ. Datele aplicative

BCU IASI CENTRALA UNIVERSITY LIBRARY

şi-au aflat utilitate atât sub raport biomedical cât şi sub raport biotehnologic.

In domeniul medical se remarcă aportul biologiei moleculare la: diagnosticul de acurateţe al unor boli congenitale; utilizarea unor teste de parentalitate; utilizarea de biopreparate (hormoni, interferon etc.); studiul genomului uman ş.a. Astfel de investigaţii constituie procedee perfectate prin lucrări asupra "geniului genetic", termen uzitat curent în literatura de specialitate de limbă franceză (v. Kaplan şi Delpech, 1990).

In domeniul biotehnologiilor caracterul aplicativ al investigaţiilor are o extindere mai vastă interesând diverse ramuri, e.g.: biotehnologia în industrie, e.g.: domeniul farmaceutic, alimentar etc. (Mainwaring et al., 1982; Micklos şi Freyer, 1990); biotehnologia în agricultură şi zoocultură (Zarnea, 1986; Jaenisch, 1988; Fiems et al., 1991).

Sub raport istoric, documentar, merită relevat faptul că preocupările mai intense legate de cercetările fundamentale şi aplicative în morfopatologie şi fiziopatologie au impus o mai rapidă dezvoltare - deşi în limite mai modeste - în domeniul patologiei umane. Astfel este posibilă explicitarea faptului că uzitarea conceptului de "patologie moleculară" - introdus în 1923 de Schade (citat de Zetkin et al., 1968), a premers pe aceea a conceptului de "biologie moleculară" - introdus în 1950 de Astbury.

O succintă retrospectivă a cercetărilor întreprinse în ultimele cinci decenii relevă realizarea unor descoperiri fundamentale referitoare la: structura biomacromoleculelor de acizi nucleici, i.e. DNA şi RNA (Watson şi Crick, 1953; Hoogsteen, 1963; Rich et al., 1984); structura protidelor; particularităţile codului genetic; biosinteza proteinelor; recombinarea genetică; eredobiologie şi eredopatologie etc. In dezvoltarea cunoştintelor şi în evoluţia biologiei moleculare, un rol esenţial au avut şi cercetarile asupra morfogenezei, în general şi a embriogenezei, în special, care au urmărit aspectele moleculare ale reproducerii, diferentierii, creşterii şi dezvoltării (Herman, 1974; Holzman şi Novikoff, 1984).

Progresele în domeniul biologiei moleculare au condus la descoperirea fenomenelor de restricţie şi modificare, a enzimelor specifice desfaşurării acestor fenomene, precum şi a tehnicilor de manipulare a DNA cromosomial, DNA plasmidal ş.a. Astfel, a devenit posibilă circumscrierea unui nou domeniu - ingineria genetică, în cadrul căruia s-a dezvoltat tehnologia DNA recombinant. Aceasta a fost receptată ca o "revoluţie în biologie" relevând căi şi mijloace adecvate aplicaţiilor în biotehnologiile moderne.

Investigaţiile cu caracter fundamental şi aplicativ asupra DNA şi îndeosebi asupra relaţiei structura chimică-activitate biologică în cazul interacţiei macromoleculei de DNA cu molecule mici, au reprezentat o altă direcţie de studiu. Aceste investigaţii, conexe unor direcţii de cercetare din biologia moleculară, au contribuit la explicitarea, în parte, a mecanismelor patologiei moleculare (denumită adesea şi "patologie biochimică") în

procesele de carcinogeneză, mutageneză şi teratogeneză (Woollan, 1972; Grover, 1979; Grünberger şi Weinstein, 1979; Alacevic, 1980; Kaplan şi Delpech, 1990; Brugge, 1991; Gârban, 1996).

Problema carcinogenezei este mult mai complexă şi interesează interacţiile DNA specifice patologiei biochimice şi mecanismele de acţiune ale diverşilor agenţi: fizici, e.g. radiaţii ionizante, radiaţii ultraviolete (Dubinin, 1996; Becker, 1973); chimici, e.g. hidrocarburi aromatice policiclice, compuşi alchilanţi, ioni metalici ş.a. (Graffi şi Bielka, 1962; Brooker şi Lawley, 1964; Lerman, 1964; Gârban et al., 1985; Lemoine şi Wright, 1993) ; biologici, e.g. oncovirusuri (Levy et al., 1994; MacDonald şi Ford, 1997).

Un alt aspect aplicativ al biologiei moleculare poate fi reprezentat de studiul mecanismelor moleculare care stau la baza chimioterapiei citostatice, e.g.: interacţia DNA cu azotiperite, cis-platina etc. (Meyers et al., 1976; Reedijk, 1984; Gârban et al., 1986, Neidle şi Varing, 1993).

4.2. GENE, ACIZI NUCLEICI, GENIUL GENETIC

4.2.1. CADRUL SINOPTIC

Evoluţia cunoştinţelor despre gene s-a datorat, în principal, tranziţiei metodologice de la mijloacele de investigaţie caracteristice biologiei celulare, la metodele specifice biochimiei. Intre acestea un rol esenţial au avut metodele analitice fizico-chimice (instrumentale) şi calculele mecanic-cuantice, care au facut posibilă apariţia biologiei moleculare şi au facilitat progresele în acest domeniu.

Primul pas important în biologia moleculară "clasică" a fost realizat prin constatarea că suportul biochimic al transmiterii caracterelor ereditare - prin inducerea transformărilor la pneumococi - este acidul deoxiribonucleic (Avery et al, 1944).

Investigaţiile asupra structurii macromoleculei de DNA au urmărit elucidarea diverselor aspecte structurale şi funcţionale, e.g.:, rapoartele (raţiile) molare ale nucleobazelor; complementaritatea nucleobazelor (A-T şi G-C); antiparalelismul catenelor (3'terminal-5'terminal, respectiv 5'terminal-3'terminal); conformaţia structurii secundare a dublului helix; relaţia structură chimică-activitate biologică ş.a. (Chargaff, 1950; Wilkins et al., 1953; Watson şi Crick, 1953a). Aceste informaţii au adus un important aport la extinderea şi aprofundarea cunoştinţelor despre gene şi au permis realizarea de noi progrese în biologia moleculara - în general şi în genetica moleculară - în special (Darnell et al., 1986 Watson et al., 1987).

Intr-o etapă ulterioară studiile intreprinse asupra relatiei dintre poliribonucleotide şi sinteza proteică (Nirenberg şi Matthaei, 1961), ca şi asupra sintezei de polinucleotide şi a codului genetic (Khorana et al., 1968) au relevat faptul că informaţia biologică definită prin secvenţele nucleotidelor din DNA dublu catenar se traduce printr-o "filiaţie moleculara" în secvenţe de acizi aminaţi, dispuşi într-o catena polipeptidică.

Toate aceste constatări, deşi spectaculoase pentru progresul biologiei moleculare, s-au limitat la organismele *procariote* utilizând un model de studiu privilegiat, i.e. Escherichia coli şi la *virusuri* - ca forme ale materiei vii acelulare, având şi acestea un model de studiu privilegiat, i.e. fagul λ. Denumirea de "fag" reprezintă abrevierea curentă pentru termenul de "bacteriofag" - care este un virus pentru procariote.

Până în anii '70 nu a fost posibilă izolarea şi cercetarea genelor din orga nismele eucariote, deci a DNA din constituţia acestora. Dificultaţile de investigare s-au datorat mărimii genelor estimate prin numărul de perechi de nucleobaze (baze azotate heterociclice) exprimat adesea prin unităţi de tipul kb (kilobaze). Noţiunea de kilobaze are sensuri diferite la DNA şi RNA (Gârban, 1992).

Dacă dificultăţile au apărut la studiul genelor din celulele eucariotice este uţor de imaginat amploarea problematicii ridicate de investigarea genomului la plante, animale şi om. Se aminteşte doar că în cazul genomului la Homo sapiens (specia umană) se estimează că acesta cuprinde 3.000.000.000 perechi de nucleobaze, i.e. 3.106 kb (Kaplan şi Delpech, 1990).

Deceniul 1970-80 a însemnat o "revoluţie metodologică" care a permis dezvoltarea rapidă a biologiei moleculare. In cadrul acestei revoluţii a fost acreditată expresia de "geniu genetic" care, ulterior, a fost retrasată conceptual, descriindu- se ca "**manipulare genetică**" (Tiollais şi Rambach, 1977). Se estimează că "revoluţia metodologica" a fost posibilă datorită perfecţionării mijloacelor de investigare (procedee microscopice şi metode fizico-chimice) şi a extinderii cercetărilor fundamentale şi aplicative care au condus la importante descoperiri. Din aceste considerente se vorbeşte despre deceniul VIII, ca despre un deceniu al revoluţiei metodologice.

Posibilitatea "manipulării genetice" a permis să se întrevadă şi riscul iminent pentru patologia moleculară. S-a întrevăzut astfel şi posibilitatea existenţei unor căi de patogenitate indusă prin lucrări in vitro. Aplicarea noilor metode a fost contestată, iar biologia moleculară a fost considerată un pericol social asemănător fizicii atomice în deceniul V, când măsurile de securitate specifice acesteia nu erau cunoscute.

A urmat o perioadă dificilă de cca jumătate de deceniu (1975-80) în care au apărut reglementări severe, adesea contradictorii, dar respectate de întreaga comunitate

internațională. Într-o următoare etapă noile metode restrictive, au constituit apanajul unor laboratoare înalt specializate în studiul DNA recombinant. Principiile de lucru au fost reglementate în 1976, de Institutul National de Sănătate - N.I.H. (National Institute of Health) din S.U.A. și publicate sub titlul "NIH-Guidelines Research Involving Recombinant DNA molecules" (Grobstein, 1977). Această publicație a fost apoi transmisă diverselor țări în care au existat laboratoare cu profil de Biologie moleculară.

Reiterând momente esențiale în "revoluția metodologică" se menționează descoperiri fundamentale cum ar fi:

- procedeul de **transcriere "in vitro"** a unei secvențe de mRNA (RNA mesager) într-o secvența de cDNA (DNA complementar) sub acțiunea enzimei numite **reverstranscriptaza**. Descoperirea existenței și acțiunii acestei enzime s-a facut inițial la ribovirusuri oncogene (Baltimore, 1970; Temin și Mizutani, 1970): *Reverstranscriptaza* sau *transcriptaza inversă* este o enzimă de tipul DNA polimerază-RNA dependentă codată de o genă a unui retrovirus (gene pol). Această enzimă asigură retrotranscriptia RNA viral în DNA dublu catenar, indispensabil ciclului biologic (replicativ) al acestui tip de virus. Retrotranscriptaza, ca enzimă, este de asemenea indispensabilă în biologia moleculară pentru sinteza in vitro a cDNA (DNA complementar).
- secționarea macromoleculei de DNA în mici fragmente de ordinul a câteva mii de perechi de nucleobaze cu ajutorul așa numitelor **enzime de restricie** (ER). Sub raportul activitătii biologice ER aparțin grupului de endonucleaze, fiind numite (la momentul descoperiri efectelor) și endonucleaze de restricție (Smith, 1970; Nathane, 1970 - citați de Kaplan și Delpech, 1990);
- realizarea integrării fragmentelor de DNA în diverși vectori, e.g.: plasmide, virusuri ale bacteriilor (bacteriofagi). Această descoperire a făcut posibilă **recombinarea DNA in vitro**. Procesul de "integrare" a fragmentelor de DNA în diverși vectori a fost posibil prin utilizarea DNA ligazelor (Watson et al., 1992);
- perfectarea procedurii denumite "**clonaj de gene**" (Berg et al., 1972-73), care este dependentă de recombinarea genică in vitro, după introducerea moleculei de DNA în bacterie (etapă de "transformare") și amplificarea moleculei de DNA (etapă de "multiplicare");
- realizarea **secvenializării de DNA** cu posibilitatea de citire a mesajului informațional - grație descoperirii metodelor de secvențializare elaborate de Sanger și Coulsen (1975), Maxam și Gilbert (1977), Sanger, Nicklen și Coulsen (1977);

- extinderea procedurii de "**clonaj la genele umane**" a furnizat date importante privind genele responsabile pentru formarea de hormoni: e.g. somatostatină (1977), insulină (1978), hormon somatotrop (1979); de interferoni, e.g.: interferoni de tip a şi b (1980); de imunoglobuline, e.g.: pentru lanţurile m şi k ale imunoglobulinelor;
- sintetizarea primelor nucleotide utilizate ulterior ca sonde moleculare (1979). Dacă începuturile acestei activităţi au avut un aşa numit caracter "artizanal" în etapele care au urmat (în deceniul IX) s-a reuşit automatizarea unor operaţii de laborator. Astfel, a devenit posibilă sinteza in vitro prin utilizarea unor **sintetizatoare automate de oligonucleotide** (obţinându-se catene care conţineau zeci de mononucleotide). Paralel cu aceasta s-a reuşit automatizarea studiului secvenţelor de mononucleotide prin punerea în aplicaţie a unor **secvenţializatoare automate.** Toate acestea au contribuit la realizarea progreselor rapide în aplicarea "geniului genetic" în domeniile biomedical şi biotehnologic (Southern, 1975; Alwine et al., 1977; Wu, 1978; Erlich, 1989; Mead, 1991);
- realizarea în condiţiile create a unor remarcabile progrese ale biologiei moleculare în **domeniul biomedical**, e.g.: clonajul şi secvenţializarea genelor interferonului (1980); clonajul genomului virusului hepatitei virale B (HVB) şi detectarea integrarii acestuia în hepatocarcinom (1980); detectarea virusului HVB în serul sanguin uman prin hibridizare moleculară (1981); obţinerea de şoareci transgenici prin practicarea unor micro-injectari cu somatotropină (recombinată cu un promotor specific); stabilirea primului diagnostic prenatal (1985) al unei boli genetice (miopatia Duchenne) cu ajutorul unui procedeu denumit uzual "polimorfismul lungimii fragmentului de restricţie al DNA" cunoscut în literatura de specialitate internaţionala prin acronimul RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism); introducerea amplificării enzimatice selective a unui microfragment de DNA in vitro (1985) prin "reacţia în lanţ a polimerazei" - metoda cunoscută în literatura internaţională prin acronimul PCR (Polymerase Chain Reaction) ş.a.;
- atingerea unor obiective importante ale biologiei moleculare în **domeniul biotehnologic**, e.g.: producerea somatostatinei (1977), producerea insulinei umane de uz medical (1982) graţie procedeelor perfectate prin mijloacele specifice manipulării genetice (i.e. denumită - în acceptia unor specialişti - "geniul genetic"); obţinerea primului vaccin recombinant anti-VHB (deci împotriva virusului hepatitei B) ş.a.

In succesiunea datelor expuse mai sus se pot delimita, în biologia moleculară, două etape cronologice:

1) etapa preliminară - care a precedat apariţia "geniului genetic", se extinde cu aproximaţie între anii 1944-1970, reprezentând perioada de iniţiere şi aprofundare a studiilor fundamentale şi aplicative bazate pe manipulare genetica;
2) etapa aplicativă - din 1970 până în prezent, caracterizată, aşa cum s-a arătat, prin extinderea procedeelor specifice aşa numitei manipulări genetice (i.e. "geniul genetic") care a vizat, în esentă, două direcţii elective distincte: domeniul biotehnologic şi domeniul biomedical.

4.2.2. INFORMAŢIA BIOLOGICĂ ŞI ACIZII NUCLEICI

Structura chimică a acizilor nucleici (DNA şi RNA) relevă existenta unor precursori nucleotidici trifosfataţi care concura la biosinteza acestor macromolecule informaţionale. In cursul formării biomacromoleculelor de DNA şi RNA are loc eliberarea mononucleotidelor constituente ale acestora.

Se reiterează aspectele de compoziţie privind principalele mononucleotide constituente, diferite la macromolecula DNA, i.e. dAMP, dGMP, dCMP, dTMP comparativ cu macromolecula de RNA, i.e. rAMP, rGMP, rCMP, rUMP. In cazul dTMP şi rUMP se poate renunţa la notaţiile pentru d (deoxiribo-) şi r (ribo-) având în vedere faptul că aceste monoribonucleotide sunt specifice acizilor nucleici respectiv.

In viziunea clasică, acizii nucleici sunt considerati macromolecule informaţionale care poarta informaţia ereditara: de la formele parentale spre formele filiale - în eredobiologie, vizând în sucesiunea generaţiilor; de la o celula la alte celule - în histologie, interesând diviziunea celulară (Haggis et al., 1967).

Informaţia genetică vehiculată de acizii nucleici este importantă în sinteza proteică. Procesul este guvernat de aşa numita "dogmă centrală a biologiei" a cărei formulare exprimată de Crick (1970) este: "informatia genetică trece de la acid nucleic la acid nucleic şi de la acid nucleic la proteină, dar niciodată de la proteină la proteină sau de la proteină la acid nucleic" (Luria, 1973; Cohen, 1976).

In accepţia acestei "dogme" informaţia genetică trece de la DNA matrice la DNA homolog, apoi de la DNA homolog la RNA mesager (mRNA) şi în final de la mRNA la proteine. In această succesiune, exprimând in facto procesele de replicaţie - transcripţie-translaţie, se realizeaza sinteza proteică (fig.4-1).

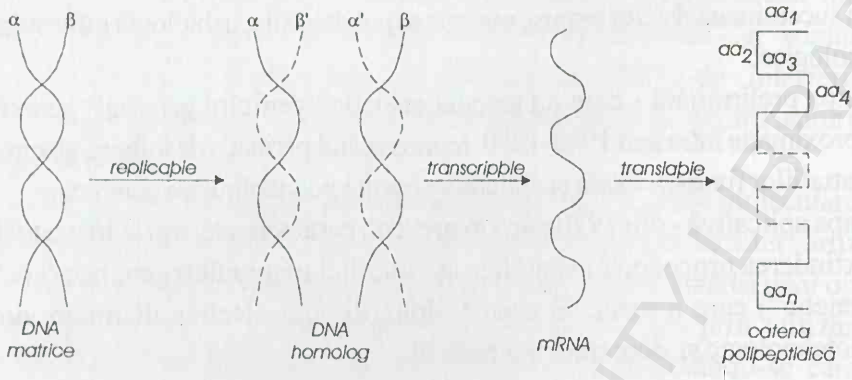


Fig. 4-1. Succesiunea proceselor de replicație-transcripție-translație (dogma centrală)
α,β - catene DNA matrice; α`,β`- catene postreplicație; aa$_1$-aa$_n$ - aminoacizi din catena polipeptidică

Cercetările întreprinse după anii '70 au condus la infirmarea, în parte, a "dogmei centrale" (Kruh, 1983; Zarnea, 1986). In continuare vor fi prezentate unele detalii privind vehicularea şi transferul informației la acizii nucleici.

Progresele realizate în domeniul biochimiei acizilor nucleici şi a biologiei moleculare au arătat că DNA şi RNA - biomacromolecule purtătoare ale informatiei genetice - pot fi sintetizate prin diverse căi biochimice (biomedical pathways) pornind de la *precursorii mononucleotidici* cunoscuți (fig.4-2).

Aceste căi biochimice, privite în ansamblu, oferă o imagine a transferului de "informație biologică", concept acreditat în prezent pentru a defini diversele particularități ale transferului de informație în cursul biosintezei acizilor nucleici. Conceptul de "informație biologică" este mai adecvat în raport cu acela de "informație genetică" pentru considerente explicitate de variatele moduri de transfer ale informației.

In biosinteza acizilor nucleici pot interveni diferite enzime, e.g.: polimeraze, replicaze, reverstranscriptaze care asigură formarea macromoleculei, dar care nu influențează succesiunea mononucleotidelor constituente (de Duve, 1991).

Remarcabil este faptul că acidul nucleic matriceal poate fi DNA sau RNA, iar compusul format în urma biosintezei poate fi, de asemenea, DNA sau RNA. Aceste variate circumstanțe sunt întâlnite în cadrul unor căi biochimice normale cunoscute în biochimie şi în fiziologie şi a unor căi biochimice "atipice" întâlnite în patologia biochimică şi în fiziopatologie.

BCU "ASACHE" UNIVERSITY LIBRARY

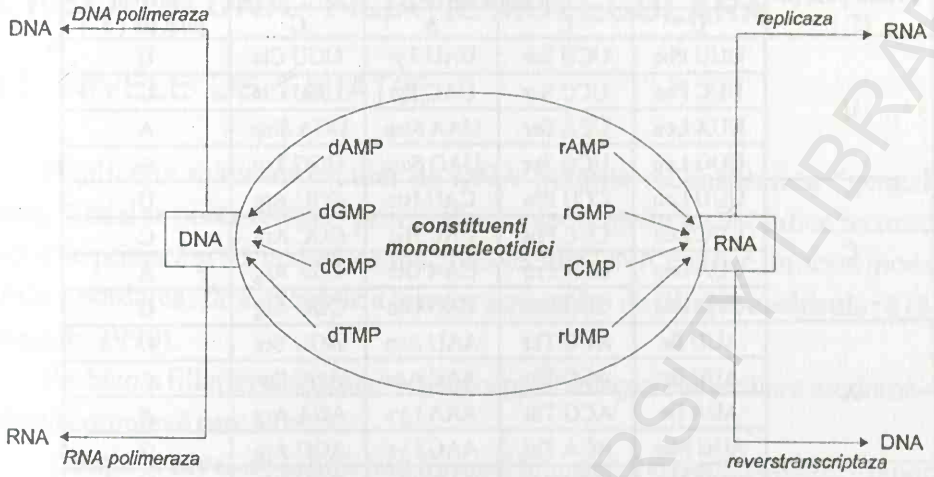


Fig. 4-2. Transferul informației biologice - prezentare schematică

Astfel în cazul biosintezei acizilor nucleici se poate porni de la:

a) DNA matrice formându-se:

a')DNA omolog - sub acțiunea DNA polimerazei, în cazul celulelor pro- și eucariote a deoxiribovirusurilor;

a") RNA (tipurile mRNA și tRNA) - sub acțiunea RNA polimerazei, în cadrul etapelor precursoare ale sintezei proteice.

b) RNA matrice din care se pot forma:

b') RNA omolog - sub acțiunea replicazei în cazul ribovirusurilor (virusuri care conțin exclusiv RNA)

b") DNA - sub acțiunea reverstranscriptazei, în cazul unor virusuri oncogene (oncovirusuri cu conținut de RNA).

La acestă cale de biosinteză se poate include și DNA complementar (cDNA) format dintr-un RNA mesager (mRNA) prin transcripție inversă sub actiunea reverstranscriptazei. Noul cDNA reprezintă o versiune de genă lipsită de constituenti de tip "intron" (în cursul biosintezei se produce " debarasarea" de introni).

Problema biosintezei și biodegradării acizilor nucleici, a particularităților structurale, a relației structura-activitate ș.a. reprezintă domenii de interes major pentru biologia moleculară.

Investigațiile asupra biosintezei acizilor nucleici și biosintezei protidelor au confirmat ideea existenței unui "cod genetic" în care unitatea specifica este **codonul**, care corespunde unui grup trinucleotidic. Fiecare codon este definitoriu pentru un aminoacid, existând însă și codoni intranscriptibili și intranslatabili (fig. 4-3).

BCU IASI DIGITAL UNIVERSITY LIBRARY

Prima poziţie (5')	A doua poziţie				A treia poziţie (3')
	U	C	A	G	
U	UUU Phe	UCU Ser	UAU Tyr	UGU Cis	U
	UUC Phe	UCC Ser	UAC Tyr	UGU Cis	C
	UUA Leu	UCA Ser	UAA *Stop*	UGA *Stop*	A
	UUG Leu	UCG Ser	UAG *Stop*	UGG Trp	G
C	UUU Leu	CCU Pro	CAU His	CGU Arg	U
	CUC Leu	CCC Pro	CAC His	CGC Arg	C
	CUA Leu	CCA Pro	CAA Gin	CGA Arg	A
	CUG Leu	CCG Pro	CAG Gin	CGG Arg	G
A	AUU Ile	ACU Thr	AAU Asn	AGU Ser	U
	AUC Ile	ACC Thr	AAC Asn	AGC Ser	C
	AUA Ile	ACG Thr	AAA Lys	AGA Arg	A
	AUG Met	ACA Thr	AAG Lys	AGG Arg	G
G	GUU Val	GCU Ala	GAU Asp	GGU Gly	U
	GUC Val	GCC Ala	GAC Asp	GGC Gly	C
	GUA Val	GCA Ala	GAA Glu	GGA Gly	A
	GUG Val	GCG Ala	GAG Glu	GGG Gly	G

Fig. 5-3. Codul genetic (prezentare generală)

Astfel de codoni sunt definiţi în prezent "Stop-codoni" care nu pot asigura participarea la biosinteza de polipeptide.

Stabilirea numărului de codoni s-a făcut pornind de la faptul că există patru tipuri (principale) de nucleobaze în DNA (A, T, G, C). Bazele se ordonează în triplete ($4^3 = 64$ triplete diferite). Aceste triplete corespund aminoacizilor (20 aminoacizi mai importanţi) din compoziţia polipeptidelor (Davidson, 1972; Bryce, 1985).

Corespondenţa existenta între structurile codonilor din acizii nucleici şi aminoacizii din polipeptide stă la baza relatiei structură chimică-activitate biologică şi asigură transcodajul. Transcodajul secvenţei de nucleotide în secvenţa de aminoacizi se realizează în citosol printr-un "sistem de traducere" (integrând etapele de transcriptie şi translaţie din clasica "dogma centrală").

Evident că în cadrul biologiei moleculare se abordează probleme complexe cu referire la nucleu, organite celulare, membrana celulară etc. Există lucrări de anvergură în domeniul biologiei moleculare a căror tematică se circumscrie uneori doar la un anumit "component" ultrastructural, e.g. membrana celulară (Benga et al., 1985). Abordarea unei problematici mai vaste este limitată de spaţiul afectat acestui capitol.

Orientarea predilectă spre studiul acizilor nucleici în biologia moleculară a avut în vedere implicarea acestor compuţi în varii domenii biomedicale şi biotehnologice.

4.3. RELAȚIA DNA - FILIAȚIE MOLECULARĂ

4.3.1. NIVELE DE FILIAȚIE

Replicația macromoleculei de DNA permite reconstituirea "genealogiei" acesteia. Astfel se poate retrasa - prin evaluarea secvențelor nucleotidice reconstitutive - structurile primară și secundară ale macromoleculei DNA matrice. In acest mod devine posibilă abordarea, fără exceptie a tuturor aspectelor de **filiație moleculară** (Kaplan și Delpech, 1990).

Problema filiației moleculare - în accepția biologiei moleculare moderne - este o problemă complexă care vizează:

- filiația la **nivel de celulă** nou formată în urma diviziunii celulare - raportată la celula parentală, situatie în care se pot studia: probleme de patologie biochimică (e.g. diagnosticul monoclonalității), probleme de genetică moleculară (e.g. definirea mono- și policlonalității).
- filiația la **nivel de individ raportat la familie** - în care se urmărește stabilirea parentalității (lat. parentes-părinți), i.e.: paternitatea și maternitatea pentru produsul de concepție. Definirea acestei filiații este importanta pentru: a) medicina legală - domeniu care implică chimia judiciară, pentru considerentul că metodele folosite aparțin analiticii chimice și biochimice; b)patologia biochimica-interesând eredopatologia, prin faptul că se procedează la investigarea bolilor cu transmitere ereditară; c) genetica animală - prin aplicarea la animalele domestice pentru cunoașterea filiației ascendenți-progenitura prin stabilirea unui test molecular al progeniturii (molecular progeny test), acesta permite selecția animalelor de rasa, înalt-productive, prin mijloace specifice biologiei moleculare (problema având o conotație zoo-economică).
- filiația la **nivel de individ raportat la diferite populații** - situație în care investigarea asupra DNA dă un caracter de acurateție în studiile de genetica a populațiilor. Investigațiile intreprinse la om în studiul acestei filiații și-a adus un real aport în antropologie (deși nu este acreditat în uzul curent conceptul de "antropologie moleculară" se poate totuși face referire la relația biologie moleculară-antropologie);
- filiația la **nivel de specii diferite raportate la apartenența taxonomică**-circumstanțe în care se procedeaza la studiul genomului (la plante și animale). In acest context s-a conturat și definit ulterior **taxonomia moleculară** (biochimică) din datele căreia s-a putut stabili apartenența diferitelor specii la

familiile şi ordinele cunoscute în taxonomie. Evident studiul acestui tip de filiaţie s-a racordat şi la problematica filogenezei moleculare.

Noul concept de "filiaţie moleculară" cu aspectele sale fundamentale şi aplicative justifică - dacă mai este cazul - utilizarea noţiunii de "informaţie biologică". Se înţelege astfel caracterul limitat de uzitare a noţiunii de "informaţie genetica" şi adesea uzitarea inadecvată a acestei noţiuni (e.g. în cazul filiaţiei la nivel celular în cazul eucariotelor).

4.3.2. MATERIA VIE ŞI SECVENŢELE DIN DNA

În prezent se consideră că evoluţia lumii vii este înscrisă în secvenţa deoxiribonucleotidelor constituente ale DNA. Un vast domeniu al investigaţiilor a fost deschis prin studiile intreprinse pe diferite organisme vii şi extinse ulterior şi la fosile. Astfel de studii au servit diverselor discipline: genetica umană, antropologia, medicina legală, eredopatologia ş.a.

Investigaţia fenotip-genotip în evoluţie, iniţial s-a limitat la definirea exonilor şi, în particular, a primelor doua triplete de nucleobaze codante. Ulterior studiul evoluţiei s-a circumscris la genom, luat în ansamblul său.

Compararea genoamelor, în accepţia data de Kaplan şi Delpech (1990), se poate efectua prin două procedee:

- direct - prin evaluarea comparativă a datelor privind *secvenţele deoxiribonucleotidice* existent la diferite specii, interesând un anumit "teritoriu genomic" dat, care conţine o anumita genă conservată;
- indirect - prin stabilirea *temperaturii de fuziune* în secvenţele unice din dublul helix rezultat prin hibridarea interspecifica dintre macromolecule de DNA comparate. Depresia acestei temperaturi reflectă gradul de diferentiere (non- apartenentă) a secvenţelor omoloage.

Evident, metodele au avantaje şi inconveniente, detalii asupra cărora nu vom insista. Dintre aceste metode prima oferă date mai elocvente.

In evaluarea evoluţiei se impune şi estimarea secvenţelor codante şi non-codante (fapt facilitat de metoda directa). In acest context secvenţa de exoni este, în general, mai bine conservata în raport cu secvenţa de introni.

Descoperirea exonilor şi intronilor în genele organismelor superioare a relevat discontinuitatea genelor (genes discontinuity). Această descoperire a condus şi la ipoteza că o genă poate produce mai multe proteine (Tonegawa et al., 1976). In această manieră s-a exclus, ca neverosimilă, clasica relaţie "o genă - o proteină" (cu formularea uzuală: o genă - o enzimă), acreditându-se în biologia moleculară relaţia "o genă - mai multe proteine".

In estimarea particularităţilor evoluţiei lumii vii un important rol în studiile asupra genoamelor, implicit a genomului uman - a cărui cartare pe cromosomi şi locusuri morbide reprezintă o direcţie majoră a cercetărilor contemporane - este rolul evolutiv independent al DNA nuclear (ereditatea cromosomială) şi DNA mitocondrial (ereditatea extracromosomială).

4.4. STRUCTURI ELECTRONICE LA NUCLEOBAZE: PARTICULARITĂŢI, IMPORTANŢĂ

Din punct de vedere biochimic macromoleculele sunt poliheteromeri rezultaţi prin policondensarea unui numar relativ redus de bioconstituenţi primari (aminoacizi, mononucleotide). Astfel, protidele sunt constituite din cca 20 specii moleculare de aminoacizi, iar acizii nucleici (DNA şi RNA) din 4 specii moleculare de mononucleotide).

Ca o trăsătură caracteristică se precizează că fiecare macromoleculă este caracterizată printr-o secventă (setulentă) de unităti constituente (formative).

Din punctul de vedere al biologiei moleculare, macromoleculele proteice sunt, în general, purtătoare de informatie. Informaţia are caracter *catalitic* în cazul proteinelor enzime şi, predilect, caracter *genetic* în cazul acizilor nucleici.

Aceste biomacromolecule - caracterizate prin structuri diferite - sunt omniprezente în sistemele biologice şi prezintă un potential informaţional considerabil, având un rol fundamental în contextul relaţiei structura chimică-activitate biologică.

Cunoaşterea detaliilor referitoare la structurile electronice ale bazelor azotate heterociclice (nucleobaze) este importantă pentru întelegerea tranziţiilor electronice care definesc la nivel submolecular anumite modificari în relaţia structura chimică-activitate biologică la acizii nucleici.

Nucleobazele sunt compuşi heterociclici care prezintă un plan de simetrie. Fiecare atom constituent (exceptând atomii de hidrogen) prezintă un orbital 2π perpendicular pe planul de simetrie, orbital angajat într-o legătură π de tipul acelei existente în benzen.

La compuşii discutaţi se întâlnesc legaturi de tipul σ şi un sistem de legături π. Legăturile σ sunt dispuse în planul de simetrie al scheletului molecular şi prezintă o simetrie axială (în unele cazuri acestea permit libera-rotaţie). Legăturile π au o simetrie plană, datorită faptului că orbitalii π (care le generează) au două regiuni de suprapunere aflate într-un plan ce trece prin axa de simetrie a legăturii π, rotirea acesteia fiind împiedicată.

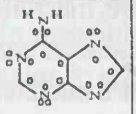
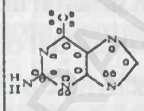
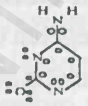
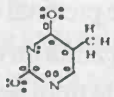
In sistemele de legături duble conjugate orbitalii atomici π se întrepătrund reciproc de-a lungul întregului lant. Astfel, **electronii π delocalizaţi**, se deplasează relativ liber pe orbitali extinşi, formând un sistem π (Swaminathan şi Sundaralingam, 1979).

Delocalizarea este însoţită de o depresie în energia moleculei al cărui cuantum este egal cu energia de delocalizare (Pullman, 1979).

In nucleobazele pirimidinice şi purinice din acizii nucleici atomii de carbon şi oxigen formează două legături în schelet şi contribuie cu câte un electron la sistemul π, pe când atomii de azot formează trei legături în schelet şi contribuie cu doi electroni la sistemul π. In scheletul heterociclic fiecare atom, exceptând hidrogenul, participă cu un orbital 2π la sistemul π.

Tabelul 4-1 se prezintă structurile electronice la nucleobaze şi date asupra numărului de orbitali şi electroni din aceşti compuşi heterociclici comparativ cu structura electronică a benzenului.(v. şi Gârban, 1994)

Tabelul 4-1 Structurile electronice ale nucleobazelor

Nr.	Compus	Structură	Orbitali π moleculari	Electroni	Orbitali	
					Ocupaţi π	Neocupaţi π*
1	Adenină		10	12	6	4
2	Guanină		11	14	7	4
3	Citozină		7	10	5	2
4	Timină		8	10	5	3
5	Uracil		8	10	5	3
6	Benzen		6	6	3	3

BCU IAŞI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Aceste date sunt importante pentru definirea tranziţiilor structurale ale nucleobazelor. Numarul orbitalilor moleculari π pentru o nucleobază oarecare va fi egal cu numărul orbitalilor atomici 2π participanţi la sistem.

In **sistemul π** se disting orbitali de energie scăzută (π) - **orbitali de legătură,** ocupaţi cu perechile de electroni disponibili din sistem şi orbitali de energie ridicată (π*) - **orbitali de antilegătură,** neocupaţi. Spre exemplu, la adenina există 6 orbitali π şi 4 orbitali π* (orbitalii sunt ocupaţi cu 12 electroni). Aceste considerente relevă faptul că în cazul nucleobazelor azotate heterociclice din acizii nucleici sunt posibile numeroase tranziţii π-π* (Sprecher şi Johnson, 1979; Gârban, 1982).

Tranziţiile electronice din nucleobaze ofera o nouă modalitate de evaluare a modificărilor structurii chimice a macromoleculelor de acizi nucleici cu implicatii asupra perturbării activităţii biologice.

Astfel de tranziţii pot însoţi formarea unor structuri bioincompatibile caracteristice proceselor mutagene şi/sau oncogene. Aceste observaţii permit trecerea de la conceptul de **patologie moleculară** (introdus într-un context mai general de către Schade, 1923) la conceptul de **patologie electronică,** acreditat în ultimii ani - dar prea puţin explicitat.

BCU IASI/CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

BCU IASI/CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

REFERINTE BIBLIOGRAFICE (SELECTIVE)

1. **Adams R.L.P., Burdon R.H., Campbell A.M., Smellie R.M.S.** – *Davidson's: The biochemistry of nucleic acids, 8. Aufl.,* Chapman and Hall, London, 1976.
2. **Alberts B., Bray D., Lewis J., Raff M., Roberts K., Watson J.D.** – *Molecular Biology of the Cell.,* 3rd edition, Garland Publ., Inc., New York-London, 1983.
3. **Arnott S.** – Secondary structure of polynucleotides, pp. 87-104 in *"First Cleveland Symposium on Macromolecules"*, Elsevier Sci. Publ. Comp., Amsterdam, 1978.
4. **Avery O.T., MacLeod C.M., McCarty M.** – Studies on the chemical nature of the substance including transformation of pneumococcal types. Introduction of transformation by a deoxyribonucleic acid fraction isolated from Pneumococcus Type III, *J. Exp. Med.,* 1944, 79, 137-158.
5. **Ayad S.R., Blamire J.** – *Tehniques of nucleic acids fractionation.* Wiley-Interscience, J. Wiley and Sons Ltd., London-New York-Sydney-Toronto, 1972.
6. **Balasubramanian D., Kumar C.** - Recent studies of the Circular Dichroism and Optical Rotatory Dispersion of Biopolimers, *Appl. Spectr. Rev.,* 1976, 11(2), 223-286.
7. **Baltimore D.** – RNA – dependent DNA Polymerase in Virions of RNA Tumor – Viruses. *Nature* (London), 1970, 226, 209-1211.
8. **Benga G.** – *Structure and Properties of Cell Membrane.* Vol.1-3, C.R.C. Press, Boca Raton, 1985.
9. **Bloom W., Fawcett D.W.** – *Histology,* 11th edition, Saunders Company, Philadelphia-London-Toronto-Mexico City-Rio de Janeiro-Sydney-Tokyo, 1986.
10. **Blorel G.** – Intracelullar protein topogenesis., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.,* 1980, 77, 1496-1500.
11. **Bryce C.F.A.** – *The Structure and Function of Nucleic Acids,* Publ. by BASC Group, High Holborn, London, 1985.
12. **Cajal N.** (Editor) – *Tratat de virusologie medicală* - Vol. I, Editura Medicală, Bucureşti, 1990.
13. **Chargaff E., Davidson J.N.** – *The nucleic acids.* Vol. I-III, Wiley and Sons, New York, 1955-1958.
14. **Cohen G.** – *Microorganismes et Biologie moleculaire,* Herman Collection Methodes, Paris, 1976.
15. **Cohn W.E.** (Editor) – *Progress in nucleic acid research and molecular biology.* Academic Press, New York, 1979.

16. **Crick F.H.C.** – Codon-anticodon pairing: the wobble hipothesis, *J. Mol. Biol.*, 19, pp.548-555, 1966.
17. **Darnell J., Lodish H., Baltimore D.** – *Molecular Cell Biology,* Sci. Amer. Books Inc., New York, 1986.
18. **Davidson J.N.** – *The Biochemistry of the Nucleic Acids,* Acad. Press, New York, 1972.
19. **de Duve** – Peroxisomes and related particles in historical perspective, Ann.N.Y.Acad.Sci., 1982, 386, 1-4.
20. **de Duve C.** – *Blueprint for a cell: The nature and origin of life.* Neil Patterson Publ., Burlington-North Caroline, 1991.
21. **Dickerson R.E., Drew H.R., Conner B.N., Wing R.M., Fratini A.V., Kopka M.L.** – The anatomy of A-, B- and Z-DNA, *Science,* 1982, 216, 475-485.
22. **Dickerson R.E.** – The DNA helix and how it is read. *Sci. Amer.*, 1983, 249(6), 94-111.
23. **Edelman G. M.** - *Topobiology: An introduction to molecular embriology*, Basic Books Inc., New York, 1988
24. **Eichhorn G.L.** (Editor) – *Inorganic Biochemistry,* Vol. II, Elsevier, Amsterdam-London, 1973.
25. **Ganong W.F.** – *Review of Medical Physiology,* 17th edition, Lange Medical Book, Norwalk, CT, 1995.
26. **Gârban Z., Voiculescu Livia, Checiu Maria, Eremia Iulia** - The action of Zn and Co upon DNA synthesis and serum proteins during prenatal development of albino rats, *Teratology*, 1984, 29(3), 23A-24A
27. **Gârban Z.** – *Noţiuni de biologie moleculară,* Vol. I, ed. 1-a, Editura Eurobit Timişoara, 1992.
28. **Gârban Z.** – *Biochimie: Tratat comprehensiv,* Vol. I, ed. 2-a, Editura Didactică şi Pedagogică R.A., Bucureşti, 1999.
29. **Gilbert W.** – DNA sequencing and gene structure. *Science,* 1981, 214, 1305-1312.
30. **Giosan N., Săulescu N.A.** - Principii de genetică, ed. 2-a, Editura Agrosilvică, Bucureşti, 1972.
31. **Goodwin T. W., Mercer E.I.** – *Introduction to plant biochemistry.* Pergamon Press Ltd., Oxford-New York-Toronto-Paris-Frankfurt, 1983.
32. **Gregoire P.E.** - *Biochimie pathologique.* Presses Academiques Europeennes Bruxelles - Librairie Maloine S.A. Paris, 1971
33. **Haggis G.H., Michie D., Muir A.R., Roberts K.B., Walker P.M.B.** – *Introduction to molecular biology.* Longmans, Western Printing Services Ltd., Bristol, 1967.
34. **Häder D.P., Häder Maria** - *Moderne Labortechniken, Geräte und Methoden*, G. Thieme Verlag, Stuttgart - New York, 1993
35. **Holmes K.C., Blow D.M.** – *The Use of X-ray Diffraction in the Study of Protein and Nucleic Acid Structure,* Wiley-Interscience, J. Wiley and Sons Ltd., London-New York-Sydney, 1965.
36. **Hoogsteen K.** – The crystal and molecular structure of hydrogen-bonded complex

between 1-methylthymine and 9-methyladenine. *Acta Cryst.*, 1963, 16 (9), 907-916.
37. **Houssier Cl.** – *Etude optique et electrono-optique des interactions des molecules d'interet biologique et de complexes macromoleculaires.* Publ. Universite de Liege, Liege, 1977.
38. **Jack A.** – Secondary and Tertiary Structure of Nucleic Acids, Vol. 24, pp.211-256, in *"International Review of Biochemistry. Chemistry of Macromolecules II A"*, (Offord R. E., Ed.), University Park Press, Baltimore, 1979.
39. **Kaplan J.C., Pesce A.J.** - *Clinical chemistry: theory, analysis and correlation,* C.V. Mosby Company, St. Louis-Toronto-Princeton, 1984
40. **Kaplan J.C., Delpech M.** – *Biologie moleculaire et medicine,* Flammarion, Paris, 1990.
41. **Karlson P.** – *Kurzes lehrbuch der biochemie für mediziner und naturwissenschaftler.* Georg Thieme Verlag, Stuttgart-New York, 1984.
42. **Kruh J.** – *Biochimie - Etudes Medicales et Biologiques.* Vol.1 Biologie cellulaire et moleculaire., Hermann, Paris, 1987.
43. **Kuwana Th.** - *Physical Methoda in Modern Chemical Analysis,* Vol. I Acad. Press, New York-San Francisco-London, 1978
44. **Levy J.A., Fraenkel-Conrat H., Owens R.A.** – *Virology,* 3rd edition, Preutice-Hall Inc., Englewood Cliffs, New Jersey, 1994.
45. **MacDonald F., Ford C.N.J.** – *Molecular Biology of Cancer*, Bios. Scientific Publishers Ltd., Oxford, 1997.
46. **Maniatis T., Frisch E.F., Sambrook J.** - *Molecular Cloning (A Laboratory Manual)*, Cold Spring Harbor - New York, 1982.
47. **Manolescu N., Ciocnitu V., Dimitriu C.** – *Ultrastructura unor celule sanguine în microscopia electronică de baleiaj,* Editura Stiințifica și Enciclopedică, București, 1979.
48. **Maxam A.M., Gilbert W.** – A new method for sequeneing DNA, *Proc. Natl. Acad. Sci. SUA,* 1977, 74, 560-564
49. **Micklos D.A., Freyer G.A.** – DNA Science - *A First Course in Recombinant DNA Tehnology,* Carolina Biol. Supply Comp., Burlington 1990.
50. **Moore P.B.** – On the modus operandi of the ribosome, *Reference*, 1987, 80, 721-728.
51. **Murgulescu I.G., Sahini V. Em.** - *Introducere în chimia fizică, Vol. I-2. Structura și proprietățile moleculelor,* Editura Academiei R.S. România, București, 1978
52. **Nirenberg M.W., Matthaei J.H.** – The dependence of cell-free protein synthesis in E. coli upon naturally occurring or synthetic polyribonucleotides. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.,* 1961, 47, 1588-1602.
53. **Olinici C.D., Vaida M.F.** – *Metode de analiză cantitativă și morfologică în biologie și medicină,* Editura Tehnică, București, 1997.
54. **Oppenheimer C.** – *Handboch der biochemie der menschen und der tiere.* 2 Aufl. Jena, 1934.
55. **Palade G.E.** – Studies on the endoplasmic reticulum, *J. Biophys., Biochem. Cytol.*, 1955, 1, 567-582.

56. **Palade G.E., Siekevitz P.** – Liver microsomes – an integrated morphological and biochemical study, *J. Biophys., Biochem., Cytol.*, 1956, 2, 171-200.
57. **Palade G.E.** – Functional changes in the structure of cell components, pp.64-80 in *"Subcellular particles"* (Hayashi T. Editor), Ronald Press New York, 1959.
58. **Perrutz M.** – *Protein structure: New Approaches to Disease and Therapy,* W. H. Freeman, and Co. New York, 1992.
59. **Ploaie P.G., Petre Zoe** – *Introducere în microscopia electronică cu aplicatii la biologia celulară şi moleculara.*, Editura Academiei R.S.R., Bucureşti, 1979.
60. **Popa L., Repanovici Rodica** - *Tehnologia DNA recombinant.* Editura Ştiinţifică şi Enciclopedică, Bucureşti, 1982
61. **Purves W.K., Orians G.B.** – *Life - The Science of Biology.* 2nd ed., Sinaner Assoc. Inc., Sunderland-Massachusetts, 1987.
62. **Rawn J.D.** – *Biochemistry.* Neil Patterson Publishers, Burlington-North Carolina, 1991.
63. **de Robertis E.D.P., de Robertis E.M.F. Jr.** – *Cell and molecular biology*, 7th ed., W.B. Sanders Philadelphia, 1980.
64. **Schwedt G.** - *Taschenatlas der Analytik*, G. Thieme Verlag, Stuttgat-New York, 1992
65. **von Sengbusch P.** – *Molekular und Zellbiologie.* Springer Verlag, Berlin-Heidelberg-New York, 1979.
66. **Simionescu Maya, Simionescu N., Palade G.E.** – Morphometric data on the endothelium of blood capillaries, *J. Cell Biol.*, 1974, 60, 128-152.
67. **Simionescu N., Simionescu Maya** – *Endothelial Cell Biology in Health and Disease*, Plenum Press, New York-London, 1988.
68. **Sinsheimer R.L.** – A Single – Stranded Deoxyribonucleic Acid form Bacteriophage ϕX 174., *J. Mol. Biol.*, 1, pp.43-53, 1959.
69. **Stevens A., Loww J.S.** – *Histology,* Gower Medical Publishing, London-New York, 1992.
70. **Stryer L.** – *Biochemistry,* 4th edition, W.H. Freeman and Comp. New York, 1996.
71. **Taşcă C.** – *Introducere în morfologia cantitativă citohistologică.* Editura Academiei R.S. România, Bucureşti, 1976
72. **Temin H.M., Mizutani S.** – RNA Dependent DNA Polymerase in Virions of Rous Sarcoma Virus. *Nature,* (London), 1970, 226, 1211-1213.
73. **Watson J.D., Crick F.H.C.** – Molecular structure of nucleic acids. A structure for deoxyribose nucleic acid. *Nature* (London), 1953, 171 (4356), 737-738.
74. **Watson J.D.** – *The double helix: A personal account of the discovery of the structure of DNA,* W. W. Norton and Co., New York, 1980.
75. **Watson J.D., Hopkins N.H., Roberts J.W., Steitz J.A., Weiner A.M.** – *Molecular biology of the gene,* 4th edition, Vol.1-2, Benjamin Cummings Publ. Comp., Inc., Menlo Park, 1987.
76. **Zarnea G.** – *Tratat de Microbiologie generală.*, Vol. I. *Virologie generală. Anatomie bacteriană,* Editura Academiei R.S. România, Bucureşti, 1983.
77. **Zarnea G.** – *Tratat de Microbiologie generală.*, Vol. IV. *Imunobiologie,* Editura Academiei R.S. România, Bucureşti, 1990.

PARTEA II

METODE SPECIFICE BIOLOGIEI MOLECULARE

5. Genomul şi organizarea genică a materiei vii 245

6. Investigarea acizilor nucleici 287

7. Recombinarea genică naturală 341

8. Recombinarea genică mediată tehnologic 357

Referinţe bibliografice (selective) 383

BCU IASI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

BCU IASI/CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

5. GENOMUL SI ORGANIZAREA GENICA A MATERIEI VII

5.1. CONSIDERATII GENERALE

In materia vie acelulară (virusuri) şi celulară (organisme procariote şi eucariote) se află constituenţi cu structură macromoleculară, care stochează şi vehiculează "informaţia biologică", denumită curent "informaţia genetică". Secunda denumire este atribuită pentru considerentul că transmiterea se face prin "gene", sau mai riguros precizat, prin acizii nucleici din constituţia acestora.

Din punct de vedere chimic, biomacromoleculele sunt compuşi rezultaţi prin polimerizarea (e.g.: policondensare, poliadiţie) unui număr relativ redus de constituenţi primari, aşa numiţii "meri". Sub aspect structural merii pot fi identici - *homomeri* sau diferiţi - *heteromeri,* iar sub raport funcţional aceşti compuşi sunt molecule mici cu rol de "starter" în procesul biogenezei macromoleculelor.

In natură există biomacromolecule constituite din homomeri, e.g.: compuşi de natură glucidică, cum ar fi amidonul şi glicogenul în care homomerul este α-D(+)-glucopiranoza, notat abreviat prin α-D(+)-Glc_p. De asemenea, există biomacromolecule constituite din heteromeri, e.g.: polipeptidele în care heteromerii sunt aminoacizi (AA) cum ar fi alanina (Ala), serina (Ser), histidina (Hys) ş.a.

În fine, o importantă grupă de compuşi macromoleculari - acizii nucleici (DNA şi RNA) - sunt constituiţi tot din heteromeri cunoscuţi sub numele de mononucleotide sau nucleozidmonofosfaţi (NMP). Intr-o prezentare generală, care face abstracţie de natura pentozei (deoxiriboză sau riboză), nucleozidmonofosfaţii cu distribuţia naturală mai vastă sunt următorii compuşii de tip purinic: adenozinmonofosfatul (AMP), guanozinmonofosfatul

(GMP), citidinmonofosfatul (CMP) şi de tip pirimidinic: timidinmonofosfatul (TMP), uridinmonofosfatul (UMP).

Pornind de la considerente de ordin structural polipeptidele se pot defini ca poliheteroaminoacizi în constituţia cărora se află cca 20 specii moleculare de aminoacizi. In mod similar, acizii nucleici se pot defini ca poliheteronucleotide constituite, în principal, din 4 specii moleculare de ribonucleozidmonofosfaţi (rNMP) în cazul RNA, i.e. rAMP, rGMP, rCMP, rUMP şi de deoxiribonucleozidmonofosfaţi (dNMP) în cazul DNA, i.e. dAMP, dGMP, dCMP, dTMP (Chargaff, 1950; Watson şi Crick, 1953; Hoogsteen, 1963; Arnott, 1978; Jack, 1979).

Trăsătura caracteristică pentru fiecare macromoleculă este definită printr-o secvenţă de unităţi constituente (i.e. "merii"). In cazul polipeptidelor şi acizilor nucleici - dată fiind natura diversă a speciilor moleculare care participă - biomacromoleculele - au caracter poliheteromer.

In accepţia biologiei moleculare, biomacromoleculele protidice pot fi considerate ca purtătoare ale "informaţiei biologice". Această informaţie are caracter *catalitic* în cazul enzimelor şi *genetic* în cazul acizilor nucleici. Astfel de macromolecule - cu structuri diferite - omniprezente în sistemele biologice, au un potenţial informaţional considerabil şi un rol fundamental în definirea relaţiei structura chimică-activitate biologică.

Progresele realizate în domeniul biologiei celulare şi moleculare au permis elucidarea a numeroase aspecte de genetică. In acest context, într-o primă etapă, s-au impus studiile întreprinse asupra cromosomilor la eucariote. Cromosomii (gr. chromaculoare; soma-corp) ca formaţiuni ale nucleului celular se definesc prin formă, mărime, număr, rol în diviziunea mitotică şi meiotică a celulelor etc. - importante iniţial pentru biologia celulară şi ulterior pentru biologia moleculară. La acestea s-au adăugat studiile referitoare la relaţia structură chimică - activitate biologică a DNA cromosomal şi extracromosomal, interesând organizarea genică a materiei vii şi definirea genomului în biologia moleculară (Sokatch şi Ferretti, 1976; Watson et al., 1987; de Duve, 1991).

Conceptul de genom – în accepţia clasică – definea suma tuturor genelor prezente în setul de cromosomi dintr-o celulă. Această încercare de formulare conceptuală s-a bazat pe studiul cromatinei din nucleele celulare ale plantelor şi animalelor superioare (metafite şi metazoare), îndeosebi pe informaţiile referitoare la compoziţia genelor i.e. DNA cromosomal din nucleul celulelor.

Evident odată cu progresele biologiei moleculare, a devenit posibilă fundamentarea conceptului de genom, pe baza unor investigaţii mai riguroase efectuate în domeniul virusologiei, microbiologiei, citologiei (vegetale şi animale), geneticii etc.

În acest scop s-au folosit, prioritar, procedee specifice microscopiei electronice

şi metode fizico-chimice specifice biochimiei analitice moderne. Se aminteşte în acest cadru faptul că în ultimele decenii s-au detaşat ca domenii cvasi-independente Chimia analitică şi Biochimia analitică. A fost lansată chiar o revistă de specialitate cu profilul de "Chimie şi Biochimie Analitică". La acestea s-au adăugat contribuţiile aduse prin extinderea cercetărilor bazate pe metodele specifice biologiei moleculare (v.Cap.6).

Astfel a devenit posibilă definirea mai clară a comceptului de genom şi caracterizarea particularităţilor morfofiziologice şi topobiochimice ale acestuia la virusuri, procariote şi eucariote.

Virusurile, considerate ca entităţi biologice acelulare, au materialul genetic inclus în core reprezentat prin *AN coreal* (acidul nucleic coreal) care poartă informaţia genetică. Acesta poate fi exclusiv sau DNA coreal sau RNA coreal (v. Cap. 1.5).

Procariotele au materialul genetic reprezentat de *DNA genoforal* care este dispus în nucleoidul din celulă. De asemenea, la procariote se află o cantitate redusă de *DNA extragenoforal*, i.e. DNA plasmidal (v. Cap. 1.6).

Eucariotele relevă o situaţia mai complexă. La acestea materialul genetic decelat în nucleul celular, se află sub formă de *DNA cromosomal*. Şi în cazul eucariotelor există o distribuţie secundară a DNA sub formă de *DNA extracromosomal* (v. Cap. 1.7). Cu privire la DNA extracromosomal se menţionează că acesta poate aparţine mitocondriilor, i.e. DNA mitocondrial (mt-DNA) sau plastidelor (în celulele vegetale), i.e. DNA plastidal, decelat mai alesîn cloroplaste, i.e. DNA cloroplastidal (ct-DNA).

Pentru elucidarea diverselor probleme de eredobiologie s-au extins iniţial cercetările în biologia celulară, care au permis aprofundarea cunoştinţelor de citogenetică şi patologie celulară (Amstrong şi Slater, 1984; Halliwell şi Gutteridge, 1986; Sahini, 1989; Popescu et a., 1998). Ulterior cercetările de biologie moleculară au oferit noi baze teoretice şi aplicative pentru genetica moleculară.

Informaţiile obţinute au relevat aspectele morfofizologice în condiţii normale şi au permis ulterior explicitarea aspectelor morfopatologice şi fiziopatologice (Stanier et al., 1970; Thomas, 1979, Feuer şi Iglesia, 1985). La baza dezvoltării acestora stau progresele realizate în "*patologia celulară*" (termen introdus în literatura de specialitate de Wirchow, în 1859) şi în "*patologia moleculară*" (termen introdus de Schade, 1923). Astfel, s-au pus bazele eredopatologiei sau mai exact a eredopatobiochimiei.

In descrierea structurii materialului genetic se are în vedere organizarea materiei vii. In acest scop s-a procedat, în continuare, la o sumară reiterare a unor date generale privind morfofiziologia şi topobiochimia virusurilor, procariotelor şi eucariotelor. Pornind de la acestea a devenit posibilă explicitarea ultrastructurii genomului şi definirea conceptului de genom.

Noţiunea de genom permite o abordare într-un cadru mai larg, a problemei genelor şi a acizilor nucleici consituenţi ai acestora. Explicitând noţiunea de genom (gr. genos - urmaş) în cazul eucariotelor se poate afirma că: genomul reprezintă totalitatea genelor prezente într-un set cromosomal haploid (n) de provenienţa paternă sau maternă. Intr-un genom se regăseşte setul de gene - specific genotipului individului - cu precizarea că în acest "set" fiecare genă constituentă este reprezentată o singură dată.

Evaluarea mărimii genomurilor se face în funcţie de cantitatea de acid nucleic din genom exprimându-se în: a) unităţi de masă moleculară - exprimate în Da (daltoni); b) număr de nucleobaze din macromoleculele monocatenare (mc) sau dicatenare (dc) - exprimate în kb (kilobaze).

Astfel, spre exemplu, în cazul exprimării în *unităţi de masă* pentru genomurile celulare (pro- şi eucariotice) se folosesc mărimi de ordinul 10^9 Da sau GDa (gigadaltoni). Pentru genomurile virale ordinul de mărime este 10^3 Da sau kDa (kilodaltoni) ajungând până la 10^6 Da sau MDa (megadaltoni). In general exprimarea se poate face în toate cazurile şi direct în daltoni utilizând indici numerici (m) şi indici de putere (n), e.g.: genomul celular conţine o cantitate de DNA de ordinul $m \cdot 10^n$ Da.

In cazul evaluării genomului în funcţie de *numărul de nucleobaze* (i.e.: nucleotidmonofosfaţi - NMP), exprimarea se face de obicei prin numărul de nucleobaze (pentru simplificare denumite "baze") din macromoleculele de acizi nucleici. Mai frecvent, ca unitate de măsură se utilizează kilobaza (kb). De remarcat însă că această mărime - conform datelor din literatura de specialitate - reprezintă 1000 de perechi de baze din macromoleculele de acizi nucleici dicatenare (e.g.: dc-DNA), sau 1000 de baze din macromoleculele de acizi nucleici monocatenare (e.g.: mc-DNA şi/sau mc-RNA).

5.1.1. GENOMUL LA VIRUSURI

Virusurile - reprezintă materia vie acelulară şi au materialul genetic constituit dintr-un singur acid nucleic: DNA coreal la deoxiribovirusuri sau RNA coreal la ribovirusuri. Materialul genetic se află dispus în corpul central (core sau miez).

Core - conţine acidul nucleic (DNA sau RNA) care formează "*genomul viral*" asigurând stocarea la acest nivel al informaţiei genetice (Cajal, 1990). Genomul viral se află în formaţiunea capitală a virusului, constituită - aşa cum s-a arătat - din core, capsidă şi peplos (acesta din urmă prezent doar la virusurile cu ultrastructură mai complexă).

Capsida (lat. capsa-cutie) - înconjoară genomul viral şi este formată dintr-un număr limitat de unităţi proteice structurale identice, numite capsomere (Maximilian şi Ioan, 1984). Morfologic capsida poate prezenta o simetrie distinctă (caracteristică diferitelor virusuri): simetrie helicoidală cu aspect helical, e.g.: la mixovirusuri; simetrie cubică cu aspect icosaedric (poliedru cu 20 de faţete sub formă de triunghiuri echilaterale), e.g.: la adenovirusuri şi reovirusuri.

Core-capsida - se constituie ca un ansamblu dintre core şi capsidă, care include

genomul viral. In genomul viral se află un număr de 3 - 250 gene care asigură replicaţia şi codifică proteinele capsidale.

Peplosul (gr.peplos-manta) - reprezintă un înveliş exterior protector pentru core-capsidă. Acesta este prezent doar la anumite virusuri.

Ca entităţi acelulare, virusurile manifestă efecte patogene în raport cu celulele procariotice (e.g. bacteriene) şi eucariotice (din organismele plantelor, animalelor şi omului). Acţiunea virusurilor este "condiţionat patogenă", necesitând prezenţa celulelor procariotice sau eucariotice, care - în această situaţie - au rol de celulă-gazdă. In interiorul celulelor-gazdă virusurile se pot dezvolta şi matura (Luria şi Darnell, 1967; Nayak, 1978; Cajal, 1990).

Virusurile bacteriilor se mai numesc şi "bacteriofagi" (gr. bakterion - bastonaş mic; phagein - a devora) sau, simplu, "fagi". Acţiunea bacteriofagului se realizează prin fixarea formaţiunii terminale (caudale) a virusului pe suprafaţa bacteriei. Fixarea este urmată de lizarea membranei celulei-gazdă şi "injectarea" în bacterie a acidului nucleic viral (Zarnea, 1983).

In etapa următoare acest acid nucleic intră în interacţie cu acidul nucleic bacterian (de fapt cu precursorii biosintezei acestuia). In final, în funcţie de natura fagului (temperat sau virulent) va avea loc lizogenia sau liza celulei bacteriene (Cernescu, 1996).

Sub raport topologic molecula de DNA dicatenar (dc-DNA) poate fi liniară sau circulară. O excepţie notabilă face virusul ϕ X174 care are o moleculă de DNA monocatenar (mc- DNA). Această moleculă îşi formează o structură dicatenară după ce accede în bacterie, deci în celula-gazdă.

La molecula de RNA de fapt RNA monocatenar (mc-RNA) există particularităţi ale procesului de replicaţie care conduc în final la formarea dc-DNA (Zarnea, 1983).

Particularităţi ultrastructurale ale genomului viral. Genomul viral, aşa cum s-a arătat, este format exclusiv din DNA coreal sau din RNA coreal.

A. *Virusurile cu DNA coreal.* La aceste virusuri cunoscute şi sub numele de deoxiribovirusuri - există DNA monocatenar (mc-DNA) sau dicatenar (dc-DNA). Între reprezentanţii virusurilor cu DNA coreal se află:

a) *virusuri mc-DNA*, e.g.: fagul ϕ 174 – constituit din 5386 resturi de nucelozidmonofosfat (dNMP). În celula-gazdă din mc-DNA al virusului se sintetizează dc-DNA de la care porneşte procesul de replicaţie. În final, din acestea se formează noul DNA coreal;

b) *virusuri cu dc-DNA*, e.g.: virusul simian SV40 – constituit din 5243 perechi de dNMP (deci 5,243 kb), virusul Papilloma - constituit din 7.900 perechi de dNMP, fagul λ – constituit din 48.502 perechi de dNMP. În celula-gazdă de la dc-DNA porneşte direct replicaţia.

În interrelaţia dintre virus (fag) şi celula-gazdă, spre exemplu între DNA coreal din fagul λ şi DNA genoforal al bacteriei Escherichia coli ca celulă-gazdă se produc recombinări (Stryer, 1991). Acestea sunt precedate de clivarea moleculară (scindarea biochimică) a moleculelor de DNA participante, proces în care intervine enzima numită *integrază*. Apoi, are loc recombinarea DNA pe loci specifici, numită curent "recombinare cu specificitate de situs". În cazul interacţiei dintre DNA coreal de la fagul λ şi DNA genoforal de la Escherichia coli ataşarea fragmentelor de DNA coreal se face pe *situsul attB* al genoforului. Acest situs este dispus între genele din operonii de galactază şi de biotină.

Recombinarea cu specificitate de situs, descrisă mai sus, este specifică ciclului viral lizogenic (v.Cap.1). Se formează astfel un DNA mixt stabil, care poate fi deschis prin clivare moleculară în prezenţa unei enzime specifice numite *excizionază*. Sinteza acestei enzime este condiţionată de *gena xis* aflată sub controlul unui represor λ prezent în genoforul bacterian.

Problema virusurilor cu DNA coreal este mult mai complexă. În acest sens se menţionează că există virusuri DNA non-peplosate şi peplosate. De asemenea, în afara virusurilor cu mc-DNA şi dc-DNA există virusuri mono/dublu catenare în care DNA are – ino tempore – regiuni monocatenare şi regiuni dicatenare. Astfel de DNA se întâlneşte la pararetrovirusuri.

Virusurile cu DNA mono/dublu catenar, după ce acced în celula-gazdă nu se integrează direct în genoforul procariotic sau în cromosomul eucariotic. Se formează un DNA neintegrat în nucleoid, respectiv în nucleu. Acest DNA neintegrat – prin transcripţie – conduce la formarea unei molecule de RNA care rămâne în citopalsma celulei-gazdă. În această situaţie intervine reverstrascriptaza care conduce, în final, la DNA matrice (de formă circulară) care va urma ciclul biologic specific virusurilor dc-DNA.

B. *Virusurile cu RNA coreal.* În cazul ribovirusurilor se distinge un genom viral în care este prezent RNA coreal monocatenar, dar şi RNA dicatenar (formă mai puţin cunoscută). Un alt aspect, cu totul remarcabil în privinţa genomului viral este acela referitor la existenţa unei polarităţi a RNA coreal numit curent RNA genomic.

Această polaritate prezentă în genomul viral a condus la descrierea a două tipuri de RNA, i.e. gRNA(+) şi gRNA(-). Notaţiile abreviate sunt coonvenţional prefixate cu litera "g" simbolizând genomul şi au semnele (+) şi (-) pentru a defini aşa numita "polaritate".

Cu privire la polaritatea genomului ribovirusurilor, convenţional s-au acreditat notările următoare:

- gRNA(+) – pentru RNA care face posibilă direct translaţia la proteine. Deci, se poate conchide că acesta prezintă similitudini cu mRNA prezent la pro- şi eucariote
- gRNA(-) – pentru RNA la care se realizează în prealabil o transcriere în RNA complementar şi apoi în proteină.

În funcţie de aceste caracteristici există diferenţe notabile între tipurile de replicaţie de la diverse virusuri. Aceste diferenţe sunt condiţionate de RNA genomic monocatenar notat gRNA(+) şi gRNA(-) sau chiar de RNA genomic dublu catenar gRNA(+/-). Astfel,

spre exemplu, există gRNA(+) la Poliovirusuri (specific pentru virusl mozaicului tutunului), gRNA(-) la Rhabdovirusuri şi gRNA(+/-) la Reovirusuri.

Problemele referitoare la genomul viral sunt mult mai complexe. Spaţiul afectat în acest volum a limitat prezentarea in extenso. Detalii asupra diverselor aspecte referitoare la virusuri se pot consulta în literatura de specialitate din domeniul virusologiei (Luria şi Darnell, 1967; Cohen, 1976; Cajal, 1990; Cernescu, 1996) şi biologiei moleculare (Alberts et al., 1983; Zarnea, 1983; Darnell et al., 1986; Kaplan şi Delpech, 1990; Garban, 1998; Israil, 2000).

5.1.2. GENOMUL LA PROCARIOTE

Procariotele - organisme prenucleate - sunt grupate în regnul Monera, care include bacteriile şi algele albastre-verzi. Sub raport ultrastructural procariotele evidenţiază: nucleoidul, citoplasma, formaţiuni intracelulare, membrana celulară, elemente apendiculare extramembranare.

Pentru a aborda problema elementelor constituitive ale "*genomului procariotic*" interesează - în mod special - *nucleoidul* - ca entitate ultrastructurală cu atribute morfofiziologice specifice şi *plasmidele* care aparţin formaţiunilor intracelulare procariotice.

Deci, se poate conchide că, în ansamblul său, materialul genetic al procariotelor este prezent în nucleoid şi este reprezentat de *DNA genoforal* şi DNA extragenoforal (deci din afara genoforilor nucleoidului) prezent în plasmside şi numit *DNA plasmidal*.

Particularităţi ultrastructurale ale DNA genoforal. La nivelul nucleoidului se "cantonează" materialul genetic specific procariotelor constituit din aşa numitul "genofor procariotic" (menţionat adesea în tratate şi sub numele impropriu de "cromosom procariotic"). In "genofor" se află DNA genoforal strâns spiralat, fiind asociat cu proteine.

Macromoleculele de DNA genoforal constituie principala parte a "genomului procariotic". Lungimea DNA genoforal este relativ destul de mare, spre exemplu, cca 860 nm la Hemophilus influaenzae şi 1,36 nm la Escherichia coli.

Din punct de vedere topologic macromolecula de are o structură dicatenară, circulară de o formă compactă datorită existenţei a 40-80 zone superhelicale. Există forme circulare închise sau chiar lineare, rezultate în urma "deschiderii prin clivaj enzimatic. În constituţia genoforului procariot s-au mai decelat două tipuri de histone cu structură diferită faţă de eucariote.

Dintre procariote mai bine studiat a fost genoforul bacteriei Escherichia coli, al cărei DNA genoforal este format din peste 4700 kb şi, care include cca 4000 de gene, dintre acestea peste 1000 având localizarea stabilită.

Studiile de secvenţializare la genomul procariotic sunt mai avansate la Haemophilus influenzae şi se extind continuu la Escherichia coli, Mycoplasma genitalium, Baccilus subtilis ş.a. În acest cadru s-a urmărit definirea interrelaţiilor între diversele secvenţe genomice şi mecanismele de reglare a metabolismului celular şi stabilirea reactivităţii în raport cu factorii de mediu extern. Numeroase studii au fost afectate evaluării influenţei induse de secţionarea catenei DNA genoforal şi legarea unor secvenţe de DNA plasmidal (tot de natură procariotă) sau de DNA coreal (de natură virală – aparţinând bacteriofagilor). De asemenea se studiază efectele induse asupra genomului de diverşi factori fizici (radiaţii) sau chimici (xenobiotice reprezentate de contaminanţi chimici sau de produse medicamentoase de uz terapeutic). În aceste condiţii este afectat procesul de replicaţie a DNA şi se pun în valoare mecanismele de reparare a structurii DNA.

Investigaţiile asupra ultrastructurii genomului bacterian a demonstrat că acesta nu are caracter static, existând continue modificări, ceea ce conferă caracter dinamic. Astfel se explică variabilitatea confirmată, de altfel, prin procesele de mutaţie şi de recombinare genică.

Particularităţi ultrastructurale ale DNA extragenoforal. Se remarcă faptul că DNA extragenoforal este de fapt *DNA plasmidal*. Aprofundarea informaţiilor asupra acestui tip de DNA a progresat odată cu investigaţiile de microscopie electronică şi de citologie, care au pus în evidenţă formaţiunile intracitoplasmatice bacteriene, îndeosebi studiul plasmidelor. Plasmidele au fost identificate ca molecule DNA dicatenar de formă circulară. S-a constatat că într-o celulă procariotică pot exista 1-100 plasmide a căror dimensiune este variabilă şi a căror principală caracteristică rezidă în faptul că prezintă replicaţia autonomă (independentă) în raport cu DNA genoforal.

Suprafaţa celulei bacteriene se poate evalua prin "încadrarea" bacteriei într-o forma geometrică regulată şi calculul suprafeţei. Astfel, s-a aflat că - spre exemplu, la Mycoplasma species suprafaţa este de: $1{,}10 \cdot 10^{-9}$ cm^2, la Saprospora grandis $12.576 \cdot 10^{-9}$ cm^2, iar la E. coli $35{,}34 \cdot 10^{-9}$ cm^2.

Escherichia coli este un organism procariot având caracteristicile morfologice ale unei bacterii cu dimensiunile aproximative de 20 nm în lungime şi 0,8 nm în lăţime. Marea majoritate a celulelor de E. coli sunt haploide şi conţin un singur genofor. Reproducerea celulelor se face pe cale asexuată.Pentru studiile de biologie moleculară, şi în general pentru studiile de genetică, E. coli prezintă anumite avantaje, e.g.: durata scurtă a unei generaţii (cca 20 de minute); rezistenţa la diverşi agenţi chimici (toxine, antibiotice) şi biologici (anumite virusuri); existenţa unei variabilităţi genetice condiţionate de mediul nutritiv; capacitatea de a genera mutaţii ş.a. Din considerentele expuse mai sus numeroase studii asupra DNA plasmidal au fost intreprinse pe E. coli.

5.1.3. GENOMUL LA EUCARIOTE

Eucariotele - organisme nucleate - includ regnuri caracterizate prin unicelularitate, i.e. Protista şi multicelularitate, i.e. Fungi, Plantae, Animalia. Ultrastructural, la eucariote se prezintă: nucleul , citoplasma, organite celulare, citoscheletul, membrana celulară, matricea extracelulară (v. Cap. 1.)

In cazul celulelor eucariotice DNA este localizat aproape exclusiv în cromosomi sub formă de DNA cromosomal. O cantitate redusă de DNA a fost decelată în mitocondrii şi cloroplaste, entităţi intracitoplasmatice care aparţin organitelor celulare. Rolul acestora în eredobiologie a fost demonstrat de studiile întreprinse în domeniul biologiei celulare şi moleculare.

Particularităţi ultrastructurale ale DNA cromosomal. Sub raport biochimic au fost efectuate determinări canitative care au evidenţiat faptul că în celulele somatice cuantumul DNA cromosomal este de două ori mai mare decât în celulele sexuale, i.e. celule gonadice (gonocite).

In structurile nucleare s-a decelat DNA cromosomal (care intră în constituţia cromosomilor), proteine histonice şi non-histonice, alături de cantităţi reduse de RNA, lipide şi cationi metalici (e.g.: Mg^{2+} şi Ca^{2+}). In cromosomi se află genele. Regiunea ocupată de o genă pe cromosom poartă numele de "locus genetic".

Din punct de vedere genetic, DNA cromosomal este principalul component al "genomului eucariotic" şi este implicat în transmiterea informaţiei genetice în eredobiologie de la generaţia parentală spre generaţiile filiale, iar în citogenetică de la celula mamă spre celulele fiice.

Particularităţi ultrastructurale ale DNA extracromosomal. In celulele eucariotice s-au decelat organite celulare, i.e. mitocondrii, cloroplaste, care conţin molecule de DNA propriu.

Astfel, la eucariote există şi o redusă cantitate de DNA extracromosomal localizat în mitocondrii şi denumit *DNA mitocondrial* (mt-DNA) şi în cloroplaste, denumit *DNA al cloroplastelor* (ct-DNA). In biologia moleculară s-a evidenţiat faptul că DNA extracromosomial intervine în biosinteza proteinelor din mitocondrii, respectiv din cloroplaste.

Investigarea structurii macromoleculei DNA şi a relaţiei structură chimică-activitate biologică la această moleculă a permis definirea mai clară a cadrului biologiei moleculare în contextul unei interrelaţii de tipul genotip-fenotip-mediu. Evaluarea acestei interrelaţii a făcut posibilă extinderea cercetărilor fundamentale şi aplicative cu caracter biotehnologic

BU "VICTOR BABEŞ" UNIVERSITY LIBRARY

şi biomedical. In această circumstanţă mediul este considerat acel sumum de factori care exprimă atât mediul extern cât şi mediul intern.

5.2. INTERRELATIA GENOTIP - FENOTIP - MEDIU

Circumscrierea problematicii legate de interrelaţia genotip-fenotip şi extinderea acesteia la mediu, comportă o abordare inter- şi multidisciplinară. In acest context se impune menţionarea faptului că "mediul", în ansamblul său, poate fi privit ca "*mediu extern*" (i.e.mediul ambiental) - în corelaţie cu arealul habitual sau ca "*mediu intern*" (millieu interieur" - în accepţia dată în 1855 de către Claude Bernard) - în corelaţie cu procesele fiziologice şi fiziopatologice.

Intr-o astfel de abordare se poate realiza trecerea de la detaliile care privesc cercetarea fundamentală (bazate pe elemente de biologie celulară şi moleculară) spre aspectele specifice cercetării aplicative (conducând la probleme de biotehnologie, farmacologie, patologie biochimică). In toate domeniile de cercetare menţionate mai sus este direct implicat mediul intern şi/sau extern.

Cadrul redus al acestui volum impune însă limitarea la problematica generală şi definirea, sumară, conceptelor şi noţiunilor necesare pentru interconexiunile care conduc spre biotehnologii. In acest context se va încerca o definire a genotipului, fenotipului, acţiunea mediului etc.

Pentru înţelegerea progresului cunoştinţelor despre gene şi genotip - ca expresie "globală" a informaţiei genice, se impune menţionarea unor etape preliminare în cercetările din domeniul eredobiologiei.

Primele constatări privind "ereditatea cromosomală" se datorează studiilor efectuate de Gregor Mendel, în 1865, asupra regulilor hibridării la plante. Acestea au fost publicate de autor în lucrarea "Versuche hber Pflanzenhybriden" publicată în 1866 (Mendel, 1866 - citat de Sengbusch, 1979). Lucrarea prezintă problema hibrizilor la mazăre (Pisum sativum), la care numărul diploid (2n) de cromosomi este 14. Studiul efectuat pe 22 soiuri de mazăre (selectate dintr-un total de 34 soiuri) a urmărit particularităţile hibrizilor vegetali, punând la baza interpretărilor teoria "*factorilor ereditari*". Prin descoperirea "eredităţii cromosomale" (numită ulterior "ereditatea mendeliană") autorul este considerat, pe drept cuvânt, părintele geneticii.

Contribuţiile ulterioare aduse, după 1900, de Correns, Tschermak şi de Vries - prin descoperirile efectuate independent de Mendel - au condus la stabilirea legilor eredităţii. In prezent există accepţia existenţei a trei legi ale eredităţii:

1. Legea uniformităţii primei generaţii hibride F1 - la baza careia se află fenomenele de recesivitate şi dominanţă;
2. Legea segregării (disjuncţiei) în generaţia a doua hibridă F2 - bazată pe segregarea (i.e.: separarea) alelelor în meioza hibridului F1.
3. Legea segregării independente a caracterelor - care se bazează pe libera combinare a genelor din cromosomi.

Cu referire la aceste legi se impune precizarea că primele două legi se aplică atât în cazul

trihibridării etc. (în general a polihibridării).

Observaţiile asupra "factorilor ereditari" şi, mai precis, asupra relaţiei acestora cu diferitele caractere manifeste observate la organisme l-a condus pe Johannsen (1909) la utilizarea noţiunii de "*genă*" pentru a denumi "*factorii ereditari*". Ulterior au fost formulate şi noţiunile de "genotip" - pentru a delimita mai mult informaţia genetică (mai exact genică) în relaţie cu aceea de "fenotip" - care se referă mai explicit la caracterele manifeste.

Aprofundarea informaţiilor asupra conceptului de genă a structurii chimice şi activităţii biologice s-a făcut îndeosebi după anii '50 . Ulterior se ajunge la sinteza "artificială" (organică) a primei gene formate dintr-o moleculă de DNA constituită din 77 deoxiribonucleotide (Khorana, 1970). Sinteza acestei molecule de DNA a fost posibilă datorită descoperirilor anterioare privind secvenţa de deoxiribonucleotide din gena care asigură formarea tRNA cu rol în activarea şi transferul alaninei (i.e.: $tRNA^{Ala}$) în cursul sintezei proteice.

5.2.1. CONCEPTUL DE GENOTIP

Genotipul (gr. gennaein - a da naştere; typos - tip, model) se defineşte prin totalitatea "segmentelor" de material genetic (i.e.: genele) care stau la originea trăsăturilor fenotipice (manifeste). Conceptul de genotip este definitoriu pentru totalitatea genelor organismului luat în studiu. Pentru acest concept există şi sinonimul **idiotip** (gr.idios - personal; typos - tip, model).

O explicitare mai riguroasă a acestui concept devine posibilă prin acreditarea notiunilor de *genom* şi *genofond,* acreditate în biologia moleculară şi în genetică.

Noţiunea de genom - în accepţia cunoştinţelor actuale - trebuie circumscrisă cu rigoare: la virusuri - prin acidul nucleic coreal (prezent în "core"); la procariote . prin DNA genoforal şi DNA extragenoforal; la eucariote - prin DNA cromosomal şi DNA extracromosomal (v. Cap. 5.1.).

Noţiunea de genofond - permite abordarea problemelor biologiei celulare şi moleculare la o scară mai mare, trecând de la indivizi la populaţii. Estimarea genofondului, evaluarea şi ocrotirea acestuia este importantă pentru om, animale şi plantele superioare. In acest sens se menţioneaza faptul că în cadrul populaţiilor mendeliene (cu reproducere sexuată), datorită recombinărilor şi mutaţiilor, genotipul fiecărui individ este diferit de al oricărui alt individ. Pornind de la acest principiu axiomatic, se poate defini genofondul.

Genofondul - reprezintă totalitatea informaţiei genetice inclusă în genotipurile tuturor indivizilor unei populaţii constituind patrimoniul ereditar al acesteia.

Problema genofondului, la oameni, poate fi privită - largo sensu - într-un context biologic, sociologic şi economic. Astfel, având în vedere faptul că între populaţiile unei specii de cele mai multe ori au loc schimburi de indivizi (ca rezultat al emigrărilor şi imigrărilor) se poate produce un "flux genetic" interpopulaţional cu modificări ale genofondului populaţiei date.

Din punctul de vedere al zooculturii şi agriculturii noţiunea de genofond este uzitată adesea cu o referire care se adresează speciei. Astfel, se ajunge la conceptul de genofond al speciei - care reprezintă totalitatea informaţiei genetice a soiurilor - în cazul anumitei specii de plante; şi raselor - în cazul unei specii oarecare de animale.

Genofondul populaţiei şi al speciei se evaluează şi se validează în raport cu ecosistemul. Modificările în genofond se realizează prin selecţie. Aceasta se adresează fenotipului, deci caracterelor manifeste apărute la indivizi dintr-o anumită populaţie.

5.2.2. CONCEPTUL DE FENOTIP

Fenotipul (gr. phaina - apariţie, ceea ce se vede; typos - tip, model) - se defineşte prin totalitatea caracterelor morfologice, funcţionale, biochimice şi comportamentale care sunt manifeste la un individ.

Cu privire la fenotip se face remarca faptului că fiecare caracter manifest are un corespondent genic în macromoleculele de acizi nucleici.

In genotipul individual - şi la o scară mai mare, în genofondul populaţional - se poate interveni (la plante şi animale) prin mijloacele specifice ale selecţiei. Fenotipul poate fi influenţat pe două căi specifice selecţiei: a) selecţia *naturală*, vizând supravieţuirea indivizilor cu genotipuri biologic necesare pentru populaţia asupra căreia se exercită; b) selecţia *artificială* (practicată de om), urmărind menţinerea indivizilor (animale, plante, microorganisme) cu genotipuri utile sub raport economic, social, biomedical etc. Cu titlu informativ se reiterează faptul că selecţia artificială prezintă două aspecte: b)selecţia progenetică - de orientare predilect biologică şi de economie rurală; b) selecţia metodică- bazată pe parametrii tehnici şi cu implicaţii economice, sociale, industriale, biomedicale.

Selecţia naturală şi/sau artificială se bazează pe faptul că fenotipul este variabil, fiind dependent de genotip şi de mediu. Această variabilitate face, de fapt, posibilă selecţia.

In definirea fenotipului - prin extensiune - s-a acreditat şi definirea caracterelor normale şi patologice. Acestea pot fi consecinţa unor perturbări ereditare (boli congenitale) sau efectelor mediului intern şi/sau extern (boli dobândite).

Mutaţiile, ca perturbări induse de agenţi fizici, chimici sau biologici, operează, de asemenea, asupra fenotipului unui organism.

5.2.3. ACŢIUNEA MEDIULUI

Interrelaţia genotip-fenotip prezintă o cauzalitate directă, dar nu totală. Această relaţie trebuie înţeleasă în sensul că genotipul unui organism determină caracterele fenotipice ale acestuia. Relaţia nu este totală, deoarece: există situaţii în care unele "elemente" din

genotip nu se manifestă întotdeauna fenotipic (e.g.: caracterele recesive); există, de asemenea, o determinantă ambientală (de mediu) a fenotipului.

Mediul trebuie privit în complexitatea sa (mediu extern şi intern) pentru a putea înţelege influenţa acestuia. In anumite limite, mediul poate influenţa expresia fenotipică a genotipului. Astfel se produc modificări bioincompatibile care pot conduce la fenomene teratogene, mutagene sau oncogene.

Remarcabil este faptul că interrelaţia genotip-fenotip-mediu relevă întreaga sa semnificaţie când se face o abordare de pe poziţiile biologiei moleculare. In acest cadru genotipul poate fi reprezentat prin DNA - care constituie substratul său material. De asemenea, se poate considera că fenotipul este reprezentat prin proteinele structurale. Exprimarea fenotipului pornind de la genotip se face prin transmiterea informaţiei genetice în succesiunea proceselor de replicaţie-transcripţie-translaţie. Mediul extern şi/sau intern, prin factorii săi, poate interveni în toate cazurile (fig. 5-1).

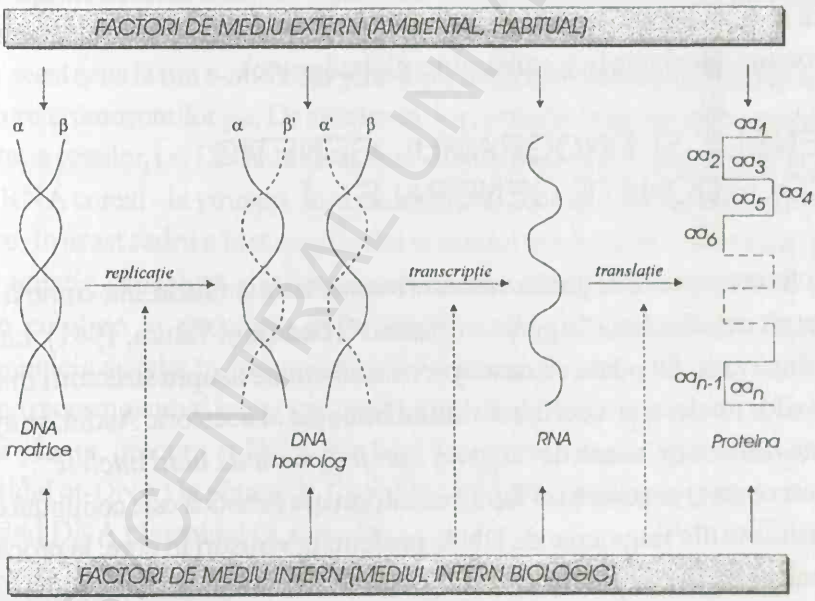


Fig. 5-1. Exprimarea interrelaţiei genotip-fenotip-mediu la nivel molecular

Factorii de mediu extern (ambiental, habitual) pot influenţa îndeosebi bioconstituenţii ca entităţi structurale definitorii pentru procesele de replicaţie, transcripţie şi translaţie, i.e.: specii moleculare de acizi nucleici DNA şi/sau RNA şi proteine.

Factorii de mediu intern (mediul intern biologic) pot acţiona atât la nivelul bioconstituenţilor principali, menţionaţi mai sus, cât şi la nivelul precursorilor acestora în

cursul proceselor de replicaţie, transcripţie şi translaţie. Aceştia pot interveni în biosinteza nucleotidelor, i.e.: deoxiribonucleotidmonofosfaţi (dNMP) şi ribonucleotidmonofosfaţi (rNMP) şi în biosinteza aminoacizilor, i.e. a diverselor specii moleculare de aminoacizi (Hood et al., 1975; Srabhai et al., 1964). Intervenţia mediului intern face obiectul predilect de studiu al biologiei celulare şi moleculare şi, din ce în ce mai mult, al patologiei biochimice (patobiochimiei). Astfel, asistăm treptat la o aprofundare a cunoştinţelor în domeniul patologiei celulare şi moleculare pentru explicitarea etiologiei şi patogeniei în diverse boli (Gregoire, 1971; Benson şi Fensom, 1985; Feuer şi Iglesia, 1985; Griffiths et al., 1993; McKusick, 1980; Lemoine şi Wright, 1993).

Informaţia genetică este "conservată" în cadrul procesului de replicatie care are caracter semiconservativ şi transmisă în cadrul proceselor de transcriptie şi translaţie.

Proteinele structurale, care definesc fenotipul în totalitatea sa, prezintă o mare diversitate (Oppenheimer, 1934; Thomas, 1936; Warner, 1987; Wilson şi Walker, 1994). Acestea au o dispunere intracelulară (e.g.: enzime, hemoglobină, colagen etc) sau extracelulară (e.g.: receptorii membranari, matricea extracelulară etc.). De asemenea, pot exista proteine circulante (e.g.: albumine, globuline etc).

5.2.4. GENELE SI PROGRAMUL GENETIC - COORDONATE GENERALE

Evoluţia conceptului de genă a cunoscut momente de confuzie. Intr-o primă accepţie s-a considerat că există relaţia "*o genă - o enzimă*" (Beadle şi Tatum, 1941). La aceasta s-a renunţat după anii `50 odată cu descoperirile efectuate asupra structurii macromoleculare a acizilor nucleici şi a definirii rolului biologic al acestora. Astfel, se ajunge la definirea unei noi relaţii, aceea de "*o genă - un fragment de acid nucleic*".

In acest context se reiterează faptul că informaţia genetică este conţinută de gene, care sunt constituite din fragmente de DNA, prezent: la virusuri în core; la procariote în nucleoid; la eucariote în nucleu (în cazul RNA viral există mecanisme specifice bazate pe activitatea reverstranscriptazei). Fragmentele macromoleculare de acizi nucleici constituie genele care în totalitatea lor formează materialul genetic la toate organismele.

Gena conţine informaţia genetică necesară sintezei unui anumit lanţ polipeptidic structural şi corespunde unui anumit fragment din secvenţa de deoxiribonucleozidmonofosfaţi (dNMP) a macromoleculei de DNA.

Informaţia genetică este *stocată* în acizi nucleici şi *codificată* prin prezenţa deoxiribonucleozidmonofosfaţilor (dNMP) în structura acestora.

Această remarcă permite concluzionarea că întreaga biosferă are un caracter unitar, existând un substrat material identic al eredității (acizii nucleici) și un mecanism similar pentru stocarea și transmiterea informației genetice.

O importantă caracteristică a fiecărui organism (individ) rezidă în existența așa numitului "**program genetic**" indus prin secvența nucleozidmonofosfaților (NMP) din fragmentele de acizi nucleici care constituie genele.

Programul genetic este stocat în informația prezentă într-un număr variabil de gene care poate fi: la virusuri de 3-4 gene; la procariote de câteva mii de gene; la eucariote multicelulare (e.g.: animale-mamifere) de câteva zeci de mii de gene.

Privind într-un context mai larg conceptul de program genetic, se poate afirma că acesta este reprezentat prin informația genetică de la nivelul genotipului.

Definirea particularităților organizării genetice la virusuri, procariote și eucariote - bazată pe preceptele ingineriei genetice și mijloacele tehnologiei DNA recombinant - a fost posibilă prin studierea detaliilor referitoare la constituția genomului, la relația structură chimică-activitate biologică, interesând programul genetic.

In acest sens la om s-au extins preocupările pentru cartarea genomului, evaluarea ultrastructurii cromosomilor ș.a. De asemenea, s-a procedat la investigarea acizilor nucleici din constituția genelor, i.e. DNA cromosomal - la eucariote; DNA genoforal - la procariote; DNA sau RNA coreal - la virusuri. În acest sens s-au utilizat metodele specifice biologiei moleculare. In acest cadru a fost aprofundat și studiul transmiterii informației genice.

O atenție deosebită s-a dat extinderii cunoștințelor asupra DNA existent în organitele celulare la eucariote și în formațiunile celulare la procariote. Acidul deoxiribonucleic decelat în "organite" și în "formațiuni" este cunoscut sub numele de: a) DNA extracromosomal eucariotic - reprezentând DNA mitocondrial (mt-DNA) la animale și plante, precum și DNA plastidal (denumit curent DNA cloroplastidic sau cloroplastidal ct-DNA) la plante (v. Cap. 1); b) DNA extragenoforal procariotic - reprezentând DNA plasmidal (v. Cap. 1)

Aceste descoperiri au condus la reconsiderarea conceptelor clasice privind genele și genomul.

5.3. TRANSMITEREA INFORMATIEI GENICE

5.3.1. PRIVIRE GENERALĂ

In cursul biosintezei proteinelor, pornind de la moleculele de Dc-DNA care conțin mesajul informațional genic, se realizează procesul de *replicație*. Apoi, având ca intermediari

molecule de mRNA - formate prin biosinteza bazată pe complementaritatea nucleobazelor - se realizează procesul de *transcripţie*. In final, pornind de la mRNA în cadrul procesului de *translaţie* se realizează biosinteza proteinelor.

In această manieră se trece de la "*limbajul codificat al deoxiribonucleotidelor*", caracterizat prin secvenţa acestora în catena de DNAdc, la "*limbajul codificat al acizilor aminaţi*" definit prin secvenţa acestora în catena polipeptidică, deci în proteine (Lwoff, 1969; Sengbusch, 1979; Kruh, 1987; Karlson et al., 1994).

Procesul de translaţie asigură şi realizarea unui mecanism de reglare a compoziţiei şi structurii proteinelor sintetizate, fapt explicabil prin existenţa unui mesaj informaţional genic (programat).

Pentru definirea mesajului informaţional biologic - prezent în genele structurale - se uzitează curent, în diverse tratate de specialitate, noţiunea de "informaţie genetică". Există însă şi motivaţia utilizării noţiunii de "informaţie genică" pentru considerentul că informaţia biologică există în gene sub forma secvenţei de nucleozidmonofosfaţi.

5.3.2. PROCESUL DE REPLICATIE

Biosinteza şi sinteza "in vitro" (sinteza organică) a moleculei de DNA necesită prezenţa unei alte molecule de DNA, considerată ca matrice. Molecula iniţială, i.e.: DNA-matrice, are rol în *autocataliza* procesului de replicaţie.

Autocataliza, în general, rezidă în amorsarea şi accelerarea unei reacţii chimice sau biochimice sub acţiunea propriului produs final. In cazul biosintezei sau sintezei DNA, autocataliza este asigurată în stadiul incipient de DNA-matrice, iar apoi de DNA rezultat din reacţie. Efectul autocatalizei se termină odată cu epuizarea precursorilor deoxiribonucleotidici de tipul deoxiribonucleozidmonofosfat (dNMP), i.e.: dAMP, dGMP, dCMP, dTMP, din mediul de reacţie.

Replicaţia (lat. replicatio-împăturire) - ca prim proces în transmiterea informaţiei biologice - se defineşte prin formarea unei molecule monocatenare de acid nucleic, considerată *replică* complementară a unei alte molecule monocatenare de acid nucleic care serveşte ca *matrice*.

In cazul utilizării noţiunii de "replicaţie" (în unele lucrări de specialitate româneşti se utilizează termenul de "replicare" - acesta având aceeaşi semnificaţie) se impune şi definirea noţiunii conexe de duplicaţie. Aceasta din urmă permite explicitarea procesului de replicaţie în totalitatea sa.

Duplicaţia (lat. duplex-dublu) - se utilizează pentru a defini formarea unei copii identice a unei molecule dicatenare de acid nucleic - duplicat, rezultată din două replicări consecutive. In unele tratate de specialitate, în locul noţiunii de "replicaţie" se foloseşte noţiunea de "reduplicaţie".

Reduplicaţia (lat. re-din nou; duplex-dublu), ca noţiune, explică - în accepţia biologică - formarea consecutivă a două molecule dicatenare de acid deoxiribonucleic în care se păstrează caracteristicile de complementaritate şi antiparalelism din molecule iniţiale.

Reduplicaţia pare a defini şi caracteriza concomitent noţiunile de replicaţie şi duplicaţie. Noţiunea se referă la molecule dicatenare la care ambele catene replicându-se concomitent conduc la formarea a două molecule dicatenare identice moleculei iniţiale (i.e. DNA omolog).

Procesul de replicaţie este posibil datorită structurii secundare a DNA, caracterizată prin complementaritatea monocatenelor, antiparalelismul acestora şi a legăturilor de hidrogen dintre nucleobazele din DNA dublu catenar (dc-DNA).

Mecanismul procesului de replicaţie, interesând problema biosintezei dc-DNA omolog, relevă existenţa a trei etape distincte:

1) Activarea deoxiribonucleozidelor 5'-trifosfatate de tipul dNTP (N-nucleobaza: A, G, C sau T) care sunt compuşi bogaţi în energie. Compuşii aceştia se pot scrie:

dNTP sau dNMP ~ P_i ~ P_i

în varianta secundă de scriere, remarcându-se prezenţa deoxiribonucleozidmonofosfatului (dNMP) şi a două grupări fosfat (P_i) cu legături macroergice (notate ~). In cazul eliberării a două molecule de fosfat se pot forma resturile de pirofosfat (notat uzual P_i-P_i) sau de ortofosfat (notat uzual P_i), fixate prin legături fosfodiesterice macroergice. Energia necesară acestei etape este asigurată şi de alte sisteme energogene, un rol prioritar având sistemul ATP/AMP^{+2} P_i, care furnizează energia în majoritatea proceselor celulare;

2) Legarea deoxiribonucleozidmonofosfaţilor dNMP (i.e.: dAMP, dGMP, dCMP, dTMP), rezultaţi prin defosforilare, la nucleobazele din una din catenele DNA matrice. In acest caz "asamblarea" se face prin legături de hidrogen;

3) Constituirea legăturilor 3'-5' fosfodiesterice între deoxiribonucleozidmonofosfaţi în prezenţa unei enzime specifice DNA-polimeraza, reacţie care decurge cu eliberarea de pirofosfat (P_i-P_i). Se consideră că DNA-polimeraza are rol activ în selecţia dNTP precursori ai catenei de DNA-omolog în curs de formare.

Precizările de mai sus se bazează pe observaţia că în cazul denaturării structurale a DNA-polimerazei este afectată "selecţia" moleculelor de dNTP precursoare ale procesului de replicaţie.

Confirmarea mecanismului de biosinteză descris s-a făcut prin experimente in vitro care au evidenţiat faptul că: a) sinteza DNA este posibilă doar în prezenţa

deoxiribonucleotidtrifosfaţilor (dNTP) şi a unei molecule de DNA-matrice (pentru amorsarea reacţiei); b) cataliza este asigurată de DNA-polimerază şi ionul Mg^{2+}; c) raţia (raportul) nucleobazelor introduse prin diverşii dNTP corespunde cu raţia nucleobazelor din DNA-matrice.

Se presupune că procesul de replicaţie - în accepţia cunoştinţelor din anii'60 - poate evolua în trei maniere:

- replicaţia conservativă - caracterizată prin formarea a două noi molecule de DNA heteroduplex: prima - având ambele catene rezultate din biosinteză (prin biosinteza DNA de novo); secunda - păstrând ambele catene ale DNA iniţial;
- replicaţia semiconservativa - în care noile molecule de DNA heteroduplex sunt constituite, fiecare dintr-o catenă rezultată prin biosinteza de novo şi o catenă reziduală, provenită din DNA iniţial;
- replicaţia dispersivă - în care noile molecule de heteroduplex se pot forma din fragmente catenare formate prin biosinteza de novo şi fragmente catenare din DNA iniţial.

Experimental s-a constatat că în natură procesul de replicaţie decurge printr-un mecanism semiconservativ.

Mecanismul procesului de replicaţie a fost elucidat prin experimentele întreprinse de Meselson şi Stahl (1958) efectuate pe DNA din E. coli, remarcându-se caracterul semiconservativ al replicaţiei. Pentru experiment celulele de E. coli au fost "cultivate" într-un mediu care a avut ca sursă unică de azot clorura de amoniu (NH_4Cl) în care există izotopul ^{15}N (deci ^{15}N - NH_4Cl). In această situaţie s-a format o moleculă de DNA cu masă moleculară mai mare, notat ^{15}N-DNA. Pentru elucidarea mecanismului s-a procedat apoi, într-o etapă ulterioară la "cultivarea" celulelor (care conţineau ^{15}N-DNA) într-un mediu care conţinea izotopul ^{14}N-DNA. Formele de DNA sintetizate: DNA greu (cu ^{15}N) şi DNA uşor (cu ^{14}N) au fost separate prin centrifugare la echilibru în gradient de densitate (mediu de CsCl). In fig. 5-2 care redă acest experiment, se observă limitele de densitate pentru ^{15}N-DNA, ^{14}N-DNA şi amestecul acestora (fig. 5-2 a,b,c) reprezentând probele de referinţă şi modificările de densitate în sistemul ^{15}N-DNA / ^{14}N-DNA (fig. 5-2 d, e) apărute după diviziuni celulare succesive. Modificările pledează pentru existenţa unui mecanism de replicaţie semiconservativ şi redau situaţia observată la celule de E. coli în cursul diviziunii celulare normale (fără utilizarea de inhibitori sau activatori biochimici).

Replicaţia semiconservativă la DNA a fost observată ulterior şi la DNA cromosomal din regnul vegetal, studiat în culturi de celule (prelevate din ţesut radicular de la plantule din răsaduri de fasole) - experimente efectuate de Taylor - citat de Lehninger (1975).

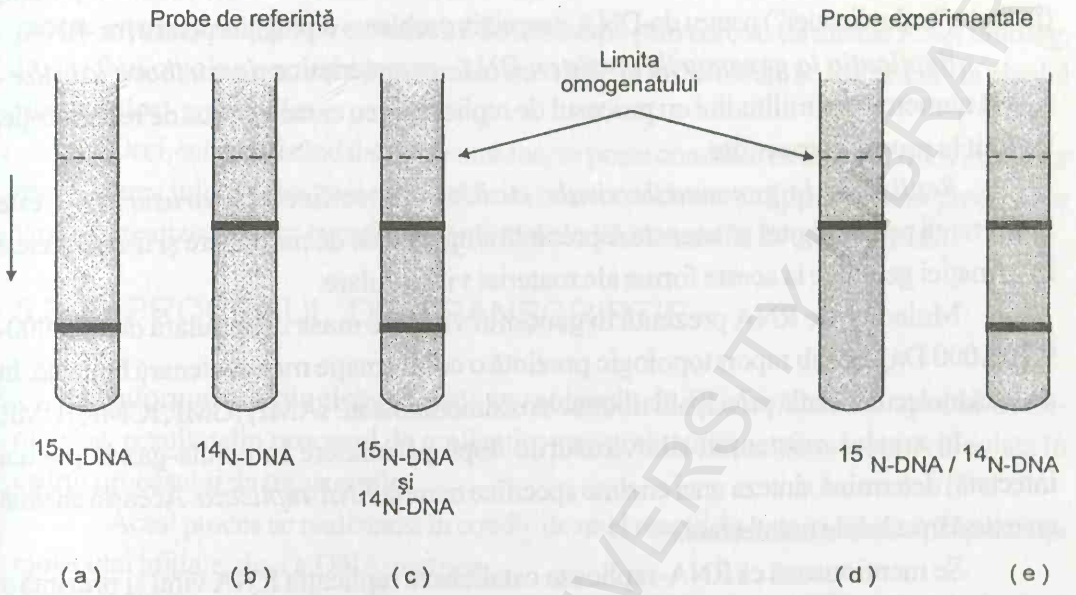


Fig. 5-2. Reprezentarea schematică a experimentului Meselson-Stahl cu centrifugarea la echilibru în gradient de densitate - mediu de CsCl (detalii în text)

S-a remarcat totodată că, in vivo, în unele cazuri, nu este posibilă replicaţia independentă a moleculelor de DNA, e.g.: DNA care - în urma unui proces de transformare sau conjugare - se integrează genoforului bacteriei-gazdă.

In alte cazuri, in vivo, replicaţia DNA poate avea loc independent, e.g.: în celulele procariotice la DNA plasmidal şi DNA genoforal; în celulele eucariotice DNA mitocondrial şi DNA cromosomal. O situaţie similară s-a putut observa la DNA cromosomal, constatându-se că replicaţia poate începe independent în mai multe "zone" ale unui cromosom.

Aceste constatări au condus la introducerea conceptului de "*replicon*" - considerat ca secvenţa unitară de DNA capabilă de reduplicaţie independentă (Jacob et al., 1963).

Funcţionarea repliconului este însă condiţionată de prezenţa "*replicatorului*" şi "*iniţiatorului*". *Replicatorul* - ca element specific al repliconului - intervine în desfacerea dublului helix şi asigurarea biosintezei catenelor complementare. *Iniţiatorul* - este o "substanţă specifică" care actionează asupra replicatorului producând declanşarea procesului de replicaţie al DNA.

Un caracter particular relevă procesul de replicaţie la materia vie acelulară unde poate exista un genom cu DNA (la deoxiribovirusuri) sau cu RNA (la ribovirusuri). In funcţie

de particularitaţile compoziţiei genomului DNA sau RNA se va discuta problema replicaţiei (în fapt a "reduplicaţiei") pentru dc-DNA, respectiv problema replicaţiei pentru mc-RNA.

Replicaţia la genomurile virale cu DNA - caracteristice *deoxiribovirusurilor* - relevă numeroase similitudini cu procesul de replicaţie - cu caracteristica de reduplicaţie, întâlnit la pro- şi eurocariote.

Replicaţia la genomurile virale cu RNA - specifice *ribovirusurilor* - este importantă pentru faptul că aceasta reprezintă singura cale de menţinere şi transmitere a informaţiei genetice la aceste forme ale materiei vii acelulare.

Molecula de RNA prezentă în genomul viral are masa moleculară de 800.000-9.700.000 Da, iar sub raport topologic prezintă o conformaţie monocatenară helicală. In această moleculă se află principalii ribonucleozidmonofosfati: rAMP, rGMP, rCMP, rUMP.

In arealul existenţial ribovirusurile după pătrundere în celula-gazdă (celula infectată) determină sinteza unei enzime specifice numită *RNA-replicaza*. Această enzimă nu există în celulele neinfectate.

Se menţionează că RNA-replicaza catalizează replicaţia RNA viral şi prezintă o strictă specificitate. Acest fapt este atestat de observaţia că RNA-replicaza virală nu intervine în replicaţia altor tipuri de RNA prezente în celula-gazdă.

Mecanismul de replicaţie la RNA prezintă, în final, similitudini cu reduplicaţia la DNA. Această similitudine rezidă în faptul că în ambele circumstanţe se regăseşte regula complementarităţii nucleobazelor. Reiterând această regulă se menţionează:

- la RNA complementaritatea G = C şi A = U;
- la DNA complementaritatea G = C şi A = T.

Graţie acestei complementarităţi se asigura fidelitatea transmiterii *informaţiei genetice*.

Dacă am dori să reprezentăm transmiterea informaţiei genice la ribovirusuri - prin similitudine cu dogma centrală la procariote şi eucariote - schema bloc ar avea forma redată în fig. 5-3.

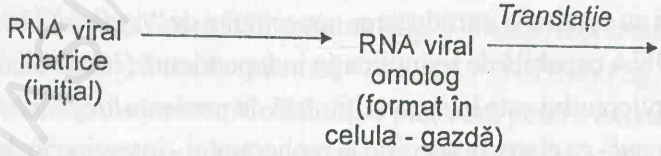


Fig. 5-3. Transmiterea informaţiei genice la ribovirusuri - prezentare schematică

Din schema bloc se remarcă faptul că în cazul ribovirusurilor, respectiv a RNA matrice, transmiterea informaţiei genice se realizează fără procesul de transcripţie. Acest

proces este surpasat, graţie procesului de replicaţie prin care se formează RNA omolog. De la RNA omolog porneşte procesul de translaţie în urma căruia se formează - la nivelul ribozomilor - proteinele.

Deci, schematizând datele de mai sus, se poate conchide că în cazul ribovirusurilor transmiterea informaţiei genice nu necesită un proces de transcripţie. Sinteza proteinelor virale se realizează prin translaţie pornind de la RNA rezultat în celula-gazdă.

5.3.3. PROCESUL DE TRANSCRIPTIE

Informaţia biologică prezentă în molecula de DNA matrice şi apoi în DNA-omolog, rezultat din procesul de replicaţie, este preluată în continuare şi vehiculată în cadrul procesului de transcripţie.

Acest proces se realizează în condiţiile unei reacţii de *heterocataliză*, în prezenţa moleculei iniţiale, deci a DNA-matrice.

Heterocataliza - rezidă în amorsarea şi accelerearea unei reacţii chimice sau biochimice sub acţiunea unei substanţe diferite în raport cu produsul de reacţie.

In cursul procesului de transcripţie specific celulelor procariotice şi eucariotice, realizat în condiţiile biosintezei sau a sintezei chimice (organice) pornind de la DNA se formează acidul ribonucleic-mesager (mRNA).

La biosinteza (sinteza) mRNA participă precursori de tipul ribonucleozidmonofosfat, i.e.: rAMP, rGMP, rTMP, rUMP-notat uneori simplu UMP prin faptul că există doar în RNA - din mediul de reacţie.

Transcripţia (lat.transcribere - a transcrie) se defineşte ca un proces în care are loc transcrierea unor părţi ale mesajului biologic (informaţional) existent în dc-DNA sub forma deoxiribonucleotidelor constituente în molecula de mRNA cu ribonucleotide complementare.

Transcripţia se realizează sub forma unor molecule specifice de RNA - predilect de RNA mesager (mRNA) - care au o secvenţă *complementară* în raport cu un fragment al moleculei de DNA original, la nivelul căruia se declanşează şi se produce biosinteza.

In cazul nucleobazelor din RNA există complementaritatea G=C, respectiv A=U faţă de DNA în care există complementaritatea G=C, respectiv A=T.

Complementaritatea moleculelor de DNA în raport cu moleculele de DNA a fost demonstrată prin formarea moleculelor hibridizate DNA-RNA. Aceste molecule sunt rezistente la acţiunea enzimelor hidrolitice specifice pentru DNA şi RNA.

Hibridizări de tipul DNA-RNA au fost decelate şi în celule, fapt care confirmă presupunerile asupra mecanismului biosintezei RNA, pornind de la DNA, deci a procesului

de transcripţie.

Biosinteza moleculelor de RNA are loc în prezenţa unei enzime specifice denumită *RNA-polimeraza-DNA dependentă* sau *transcriptaza*. Această enzimă, în prezenţa unei molecule de DNA primare (iniţiale), catalizează biosinteza unei molecule de RNA complementare.

Rolul catalitic al transcriptazei presupune existenţa în mediu a ribonucleotidelor trifosfatate (rNTP sau rNMP $\sim P_i \sim P_i$) caracteristice, i.e.: rATP, rGTP, rCTP şi rUTP (sau simplu UTP). Din acestea, prin eliberarea grupărilor fosfat macroergice:

$$\text{rNTP sau rNMP} \sim P_i \sim P_i \longrightarrow \text{rNMP} + P_i - P_i$$

se vor forma monoribonucleotidele numite curent ribonucleozid monofosfaţi (rNMP) care sunt, in facto, precursorii RNA.

Studiul posibilităţilor de sinteză a RNA "in vitro" a condus la izolarea - din ţesuturile vii - a unei alte enzime denumită polinucleotidfosforilaza. Această enzimă catalizează "in vitro" - şi în absenţa moleculei de DNA - sinteza RNA prin policondensarea dezordonată a ribonucleoziddifosfaţilor (i.e.: rADP, rGDP, rCDP, rUDP).

Astfel, in vitro se pot obţine poliribonucleotide artificiale, deci RNA, fără a exista o dirijare a secvenţei ribonucleotidelor constituente.

Se estimează că polinucleozidfosforilaza intervine şi "in vivo" în reacţia de hidroliză a legăturilor fosfodiesterice (fosforoliză). In urma acestei reacţii se produce descompunerea moleculei de RNA.

Comparând procesul de replicaţie cu procesul de transcripţie produse in vivo se pot remarca urmatoarele particularităţi:

- în replicaţie - ambele catene ale DNA dublu catenar pe întreaga lungime a acestora servesc ca matriţe pentru biosinteza a două noi molecule de DNA dublu catenar;
- în transcripţie - DNA are rol de matriţă doar la nivelul uneia din catene şi numai pe o anumită porţiune a acesteia considerată "unitate de transcripţie" (i.e.: operon), astfel că pentru fiecare porţiune transcrisă a unei catene din DNA dublu catenar se formează o singură moleculă de RNA monocatenar.

Prin cercetări experimentale s-a putut constata că "in vivo" procesul de transcripţie se realizează întotdeauna la nivel monocatenar.

Transcripţia monocatenară - este un proces caracterizat prin preluarea mesajului biologic de la un fragment al unei catene - considerat unitate de transcripţie - din DNA

dublu catenar şi transcrierea acestuia sub forma unei secvenţe de ribonucleotide în cursul sintezei RNA.

Spre deosebire de datele indubitabile privind transcripţia monocatenară "in vivo" s-au relevat unele aspecte diferite ale sintezei DNA "in vitro". Astfel "in vitro", datorită procedeelor de extracţie laborioase, se produc inevitabile modificări structurale ale moleculelor de DNA supuse extracţiei. Moleculele de DNA obţinute prin extracţie permit în unele cazuri transcripţia concomitentă după ambele catene.

Cercetările "in vivo" asupra biosintezei mRNA au condus la introducerea *conceptului de operon* pentru explicitarea mecanismului de transcripţie. Astfel, prin cercetările întreprinse de Jacob şi Monod (1961) pe E. coli s-a constatat că biosinteza mRNA este matriţată de un segment de DNA mai lung decât o unică genă. Aceste consideraţii au condus la conceptul de operon.

Operonul - se defineşte ca un segment continuu al unei macromolecule de DNA cromosomal, care corespunde unui anumit grup de gene.

Un operon este format din patru tipuri de componente:

- gena operatoare (operonul) - este dispusă în partea proximală a operonului, precedând promotorul, prima genă a catenei. Acest fragment din DNA (i.e.: operatorul) conţine informaţia genică necesară controlului proceselor de transcripţie şi translaţie la nivelul DNA. Operatorul se poate afla în stările: biologic *activă* - când asigură activitatea genelor structurale şi în continuare biosinteza mRNA şi a polipeptidei corespunzătoare; biologic *inactivă* - ca urmare a inactivării produse de un represor, situaţie în care genele structurale nu pot asigura biosinteza mRNA şi în continuare a proteinelor structurale;
- promotorul - o microregiune a DNA dispusă între "operator" şi "prima genă structurală". Se consideră că promotorul reprezintă "punctul de iniţiere" al biosintezei mRNA. La nivelul promotorului se leagă specific moleculele de RNA polimerază-DNA dependentă care asigură începutul procesului de transcripţie monocatenară;
- genele structurale (cistroni) - stau la baza biosintezei mRNA. Există corespondenţa o genă structurală - o catenă de mRNA. In continuare acest mRNA se află la originea biosintezei unui lanţ polipeptidic. Deci, se poate conchide că genele structurale conţin informaţia biologică (genică) care este transcrisă şi apoi translatată pentru sinteza proteică;
- gene reglatoare - sunt dispuse alături de gena operatoare. Fiecare genă reglatoare se consideră că stă la originea unei polipeptide cu rol de represor. Represorul acţionează asupra mecanismelor de represie şi depresie enzimatică. Represorul poate bloca o

genă operatoare şi prin aceasta funcţionarea întregului operon. Mecanismul de blocare a genei operatoare rezidă în legarea represorului de produsul final al unei anumite căi biochimice (i.e.: căi metabolice). Un astfel de produs final este numit corepresor şi poate fi un metabolit oarecare specific pentru calea biochimică luată în consideraţie.

In ansamblul său procesul de transcripţie are loc independent, în mai multe zone ale macromoleculei de DNA.

Mecanismul procesului de transcripţie poate fi explicitat prin existenţa a trei etape distincte:

1) Delimitarea zonelor specifice din macromolecula de DNA prin acţiunea de "recunoaştere" a RNA polimerazei-DNA dependente - zone care se vor detaşa din cadrul macromoleculei dicatenare. Astfel, în Dc-DNA se vor delimita fragmente caracterizate printr-o anumită succesiune a deoxiribonucleotidelor la nivelul căreia, după detaşarea şi distanţarea catenelor, devine posibilă biosinteza RNA (fig. 5-4).

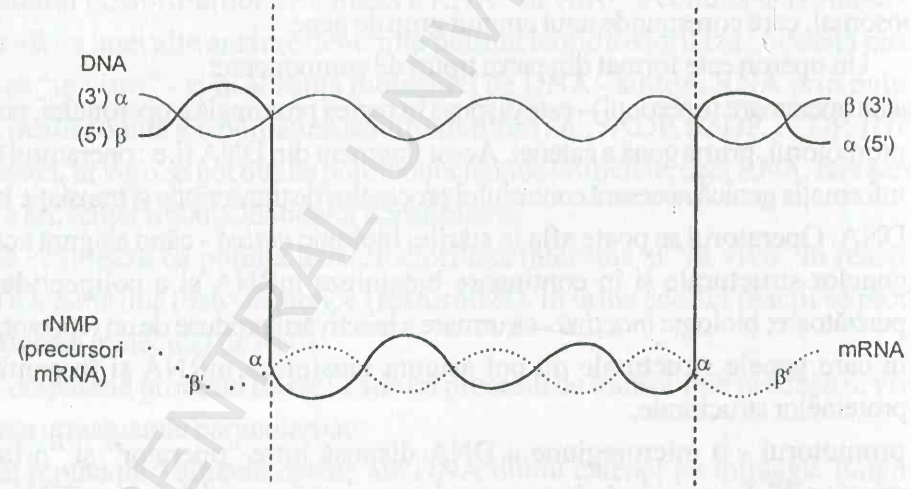


Fig. 5-4. Procesul de transcripţie-reprezentare schematică generală

2) Formarea secvenţei de ribonucleozidmonofosfaţi (rAMP, rGMP, rCMP, rUMP) şi constituirea mRNA în funcţie de matriţarea asigurată de catena de DNA detaşată din dublul helix. S-a constatat că formarea moleculei de mRNA are loc într-un sens determinat: formarea monocatenei poliribonucleotidice care are loc în direcţia 5'-3' (deci porneşte de la extremitatea 5' a catenei spre extremitatea 3'). In cadrul DNA dublu helix, pe catena detaşată procesul de transcripţie - cu respectarea complementarităţii nucleobazelor are loc în direcţia 3'-5'. In cursul biosintezei mRNA coexistă sub forma unei structuri hibridizate de tipul DNA-RNA (menţinută de RNA

polimeraza-DNA dependentă) două catene: DNA monocatenar detaşat din DNA dicatenar care conţine informaţia genică şi mRNA monocatenar nou sintetizat.

3) Finalizarea biosintezei mRNA la o anumită deoxiribonucleotidă din catena detaşată din dc-DNA, corespunzător unei anumite gene structurale. După aceasta are loc eliberarea moleculei de mRNA, semnificând încheierea procesului de transcripţie.

Studiul experimental al transcripţiei la eucariote s-a efectuat cu ajutorul radio-izotopilor ^{3}H şi ^{14}C cu care s-a făcut marcarea uridinei - nucleozid care conţine uracilul (nucleobază pirimidinică). Deci, utilizându-se ^{3}H-uridina (uridina tritiată) şi ^{14}C-uridina (uridina cu radiocarbon ^{14}C) a devenit posibilă identificarea zonelor din DNA la nivelul cărora s-a produs sinteza de mRNA.

S-a constatat, de asemenea, că sinteza de mRNA are loc în nucleu şi în anumite zone - strict delimitate - ale cromosomului. Această observaţie atestă faptul că doar anumite fragmente din Dc-DNA din cromosom participă la procesul de transcripţie.

5.3.4. PROCESUL DE TRANSLATIE

După cum s-a văzut în definirea şi descrierea proceselor de "*replicaţie*" şi "*transcripţie*" se operează cu noţiunea de "informaţie genică" - caracterizată prin secvenţa deoxiribonucleotidelor din molecula de dc-DNA preluată şi transmisă moleculei de mRNA prin complementaritatea nucleobazelor.

In etapa posttranscripţională la eucariote mRNA nou format se asociază cu ribozomii citoplasmatici participând la procesul de translaţie care asigură sinteza proteinelor.

In definirea procesului de *translaţie* se operează cu conceptul de "translatare a informaţiei genice" - caracterizată prin realizarea unei anumite secvenţe a aminoacizilor din molecula polipeptidică rezultată în final.

5.3.4.1. Specificul translaţiei

Translaţia (lat. translatio-traducere, translatare) - se defineşte ca un proces în care are loc *translatarea* informaţiei existente în moleculele de mRNA - sub forma unei secvenţe de ribonucleotide (i.e.: ribonucleotidmonofosfaţi), în molecule polipeptidice - sub forma unei secvenţe de aminoacizi.

Prin sinteză proteică se asigură transmiterea "informaţiei genetice" - denumire curent uzitată în tratatele de specialitate. O denumire mai riguroasă sub raport topobiochimic este aceea de "informaţie

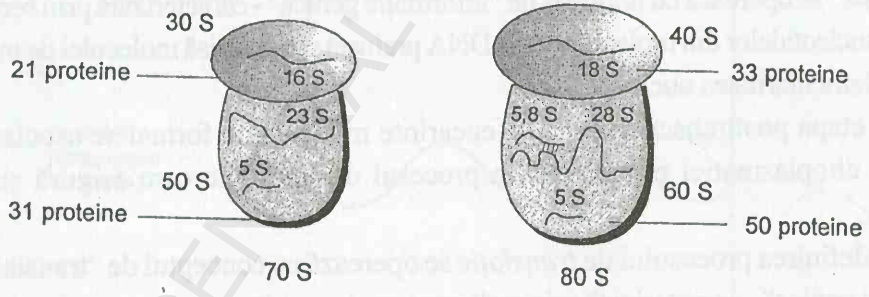
genică", prin intermediul căreia se realizează transmiterea însuşirilor morfo-funcţionale în cadrul relaţiei genotip-fenotip.

Translaţia se produce în două circumstanţe bine definite (Haggis et al.1967), menţionate în continuare:

(α) - transmiterea mesajului genic de la o generaţie la alta (i.e.: de la generaţia parentală la generaţia filială) - situaţie care interesează genetica eredităţii şi - în general - eredobiologia;

(β) - transmiterea mesajului genic de la o celulă la alta în cursul diviziunii celulare - situaţie caracteristică pentru citogenetică şi - în general - pentru citologie.

Procesul de translaţie prezentat mai sus permite explicitarea unor aspecte caracteristice şi comune pentru biosinteza proteinelor de la bacterii până la om. La biosinteză participă ribosomii prezenţi în reticulul endoplasmatic. Ribosomii se caracterizează, în funcţie de constanta de sedimentare (S_{20w}) exprimată în unităţi Svedberg (S) - v. Cap. 2 Astfel, la procariote există ribosomi cu constanta de sedimentare de 70 S având subunităţi de 30 S şi 50 S, iar la eucariote există ribosomi cu constanta de sedimentare de 80 S având subunităţi de 40 S şi 60 S (fig. 5-5). S-a constatat că valorile S_{20w} la eucariote diferă în limite strânse, astfel la plante este 80 + 1 S, iar la animale este 80 + 3 S. Pentru constantele de sedimentare decelate corespund anumite valori ale numărului de nucleobaze (nb).



c.s.	16 S	(1540 nb)	c.s.	18 S	(1900 nb)
c.s.	23 S	(2900 nb)	c.s.	28 S	(4800 nb)
c.s.	5 S	(120 nb)	c.s.	5,8 S	(160 nb)
			c.s.	5 S	(120 nb)

Fig. 5-5. Ribosomi la procariote şi eucariote (crochiu de ansamblu)

La studiul structurii, morfologiei şi activităţii biologice a ribosomilor, un aport fundamental şi-a adus savantul american de origine română, G.E. Palade (1959). Prestigioasele rezultate obţinute de A. Claude, G.E. Padale, C. deDuve şi Albert au fost unanim recunoscute şi au stat la baza atribuirii premiului Nobel (1976).

Ribosomii procariotici şi eucariotici conţin catene de RNA ribosomal (rRNA) şi proteine. Caracterizarea RNA se face prin constantele de sedimentare (S_{20W}) a diferitelor fragmente din subunităţile: minoră (pars minor) şi majoră (pars major), iar caracterizarea proteinelor se face în raport cu varietatea acestora.

Astfel, ribosomul procariotic (70 S) are subunitatea mică formată din RNA cu S_{20W} : 16 S şi din 21 proteine, iar subunitatea mare este formată din DNA cu S_{20W} de 23 S, respectiv 5 S şi din 31 proteine.

Studiindu-se ribosomul eucariotic s-a constatat că acesta prezintă subunitatea mică (40 S) constituită din RNA cu S_{20W} 18 S şi din 33 proteine iar subunitatea mare (60 S) cu RNA în formaţiuni cvasi libere având S_{20W} de 28 S, respectiv 5,8 S şi un fragment independent cu S_{20W} 5 S, alături de 50 proteine.

In cursul biosintezei proteinelor o catenă de acid ribonucleic mesager - mRNA se asociază ribosomilor. In această situaţie ribosomii dispersaţi se constituite în "agregate ribosomale" numite "*poliribosomi*" (fig.5-6).

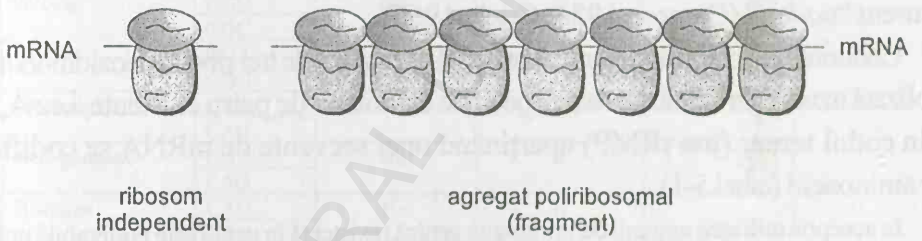


Fig. 5-6. Ribosomul şi poliribosomul - fragment (prezentare generală)

Ribosomii liberi, consideraţi adesea ca "unităţi ribosomale" au caracteristic faptul că prezintă o constantă de sedimentare specifică tipului de celule, i.e.: la celula procariotică 70 S, iar la celula eucariotică 80 S.

Poliribosomul, numit adesea şi "polisom" (gr. polys-multe; soma-corp), este un "agregat" constituit din mai mulţi ribosomi legaţi printr-o moleculă de mRNA care serveşte ca matriţă pentru biosinteza proteinelor.

Se poate afirma că poliribosomii reprezintă forma activă a ribosomilor în sinteza proteinelor.

Numărul de ribosomi din agregatele ribosomale diferă în funcţie de lungimea catenei de mRNA. Evident, acest fapt va condiţiona şi mărimea catenei polipeptidice rezultate, e.g.: în cazul biosintezei de hemoglobină se constituie agregate ribosomale formate din 4-6 ribosomi.

5.3.4.2. Caracteristicile codului genetic

Molecula de acid monoribonucleic mesager - mRNA care participă la sinteza proteică este formată din triplete de "ribonucleotide" sau "ribonucleozidmonofosfaţi" (rNMP). Aceste triplete constituie aşa numitul "*cod genetic*", fiecare triplet având o anumită semnificaţie în procesul de codificare, deci în procesul de formare a aminoacizilor (AA) care participă la formarea catenei de poliheteroaminoacizi.

Termenul de "**cod**" (lat. codex-sumum de dispoziţii legislative) defineşte corespondenţa existentă - în etapa procesului de translaţie - între ribonucleozidmonofosfaţii din mRNA i.e. rAMP, rGMP, rCMP, rUMP (notaţi uzual prin nucleobazele respective i.e.: A, G, C, U) şi aminoacizii din polipeptida nou sintetizată. In mod curent, pentru facilitarea redării şi explicitării noţiunilor, "codul" se simbolizează doar prin trei nucleobaze succesive corespunzătoare pentru unul sau mai mulţi aminoacizi, e.g.: CUA pentru Leu; GCC pentru Ala; AGC pentru Ser ş.a.m.d.

Corespondenţa acestora este exprimată printr-o "*unitate de cod*" denumită în mod curent "*codon*" (Gamow, 1954; Crick, 1966).

Codonul, sub raport structural, reprezintă o secvenţă de trei ribonucleozidmonofosfaţi (simbolizată uzual prin trei nucleobaze specifice din totalul de patru existente, i.e.: A, G, C, U). Din codul ternar (trei rRMP) aparţinând unei secvenţe de mRNA se codifică un singur aminoacid (tabel 5-1).

In accepţia utilizării noţiunii de informaţie genică (existentă în gene) este preferabilă utilizarea alături de termenul de "*cod genetic*" al aceluia de "*cod genic*", pentru considerentul că acest "cod" este exprimat prin succesiunea ribonucleozidmonofosfaţilor din mRNA.

In cursul biosintezei proteinelor intervine şi acidul ribonucleic de transfer tRNA care are rol în transportul diverşilor aminoacizi participanţi la formarea catenei polipeptidice.

Codul genetic ca mijloc de realizare a transmiterii informaţiei genetice (i.e.: genice) prezintă câteva caracteristici structurale şi funcţionale: a) universalitatea; b) identitatea raportului de codificare; c) univocitatea informaţională; d) diversitatea structurală şi funcţională; e) degenerarea codului; f) non-superpozabilitatea constituenţilor.

a) Universalitatea codului

Această caracteristică rezidă în faptul că acest cod este utilizat de toate organismele vii (pro- şi eucariote) şi chiar de materia vie acelulară (virusurile) în condiţiile parazitării celulei-gazdă.

Tabel 5-1. Interrelaţia dintre aminoacizii sintetizaţi şi unităţile de cod din mRNA

Denumirea aminoacidului	Unitatea de cod	Abrevierea AA		Observaţii
		Triliterală	Monoliterală	
Alanina	GCU	Ala	A	-
	GCC			-
	GCA			-
	GCG			-
Arginina	AGA	Arg	R	-
	AGG			
	GGU			
	CGC			
	CGA			
	CGG			
	AGA			
	AGG			
Asparagina	AAU	Asn	N	-
	AAC			
Acid aspartic	GAU	Asp	D	-
	GAC			
Cisteina	UGU	Cys	C	-
	UGC			
Fenilalanina	UUU	Phe	F	-
	UUC			
Glicina	GGU	Gly	G	-
	GGC			
	GGA			
	GGG			
Glutamina	CAA	Gln	Q	-
	CAG			
Acid glutamic	GAA	Glu	E	-
	CAG			
Histidina	CAU	His	H	-
	CAG			
Izoleucina	AUU	Ile	I	-
	AUC			
	AUA			
Leucina	UUA	Leu	L	-
	UUG			
	CUU			
	CUC			
	CUA			
	CUG			
Lisina	AAA	Lys	K	-
	AAG			
Metionina	AUG	Met	M	-
-	UAA	-	-	STOP
-	AUG	-	-	STOP
-	UGA	-	-	STOP
Prolina	CCU	Pro	P	-
	CCC			
	CCA			
	CCG			
Serina	UCU	Ser	S	-
	UCC			
	UCA			
	UCG			

BCU IAŞI - CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Experimental s-a constatat că diferiţii codoni sunt translataţi în aceeaşi manieră de către aşa numitul "*aparat de translaţie*" (asupra căruia vom mai reveni). Translatarea se face identic la viruşi, la bacterii, la plante, la animale şi la om.

Această "universalitate" poate fi totuşi perturbată in vivo, condiţionat de anumiţi factori (fizici, chimici), ceea ce face ca anumiţi codoni sinonimi să fie translataţi nespecific. Non-specificitatea translaţiei codonilor poate să apară între diferitele celule în situaţii limită care afectează structura moleculelor de acizi nucleici (e.g.: mutaţii genice).

b) Identitatea raportului de codificare

Derivă din structura tripletică a codonului din mRNA. Codonul este reprezentat - aşa cum s-a arătat mai sus - prin trei ribonucleotide succesive (notate, uzual, prin nucleobazele acestora), poate codifica doar un aminoacid. Astfel, s-a conchis că există un raport de codificare exprimat prin raţia ribonucleotide : aminoacizi = 3:1.

Problema structurii tripletice a codului a fost elaborată teoretic de Gamow (1954) care a încercat să releve o corespondenţă între numărul de nucleobaze (4) şi numărul de aminoacizi (20), evident luând cifre limită pentru compuşii cu o răspândire mai largă. Astfel, s-a arătat că: un cod simplu $4^1 = 4$ poate codifica doar 4 AA; codul dublet $4^2 = 16$ codifică aminoacizi, de asemenea, un număr prea restrâns de AA; codul triplet $4^3 = 64$ poate codifica numărul de 20 AA luaţi în studiu.

Cercetări efectuate pe bacteriofagul T4, întreprinse de Crick et al. (1963) au demonstrat că există un cod tripletic de nucleobaze, iar raportul de codificare (engl. coding ratio), nucleobaze : aminoacizi are valoarea 3 : 1. Intre codoni nu există semne distinctive care să indice începutul sau sfârşitul unui codon.

c) Univocitatea informaţională a codului

Atestă modul de transmitere a informaţiei, mai exact "direcţia transmiterii". Transmiterea se realizează exclusiv de la nucleotide, i.e. ribonucleozidmonofosfaţi (rMNP) spre aminoacizi. Această transmitere este univocă şi asigură desfăşurarea normală a sintezei polipeptidelor. Univocitatea codului asigură aşa numita *"coliniaritate a produselor genice"* - deci a polipeptidelor sintetizate printr-o anumită secvenţă a aminoacizilor. Univocitatea se află la baza aşa numitei "programări genetice" şi are importanţă esenţială în eredobiologie.

d) Diversitatea structurală şi funcţională

Se evidenţiază prin relaţia structură chimică-activitate biologică evaluată la nivel de codoni. In acest context este reiterat conceptul conform căruia fiecare codon din RNA

(la pro- şi eucariote din mRNA) asigură codificarea unui aminoacid. Această particularitate nu este general valabilă, ceea ce a condus la ideea de diversitate structurală şi funcţională. In această accepţie s-au decelat mai multe tipuri de codoni:

- *codon cu sens* - codonul se defineşte prin capacitatea de-a codifica un singur aminoacid.
- *codon missens* sau *codon eronat* - codonul cu structură modificată rezultat dintr-o mutaţie. Codonul missens (engl. missens-sens eronat) poate proveni dintr-un codon cu sens. Noul codon, după mutaţie codifică un aminoacid diferit în raport cu codonul iniţial.
- *codon nonsens* - codonul care nu poate codifica nici un aminoacid. Un astfel de codon este numit şi codon "*terminator*" ("*terminal*") sau codon "*stop*", pentru considerentul că asigură finalizarea biosintezei lanţului polipeptidic. Se notează uzual prin "Ter" sau prin "Stop". Experimental s-a stabilit că există trei codoni nonsens: UAA (Ochre); UAG (Amber), UGA (Umber). Aceşti codoni determină terminarea (stoparea) biosintezei catenei polipeptidice. Denumirile de "*Ochre*" (engl. Ochre - culoarea ocru) şi "*Amber*" (engl. Amber - chihlimbar) definesc codonii UAA, respectiv UAG şi derivă de la denumirea unor mutante care produc, la fagul T4, terminarea biosintezei catenei polipepidice.

e) Degenerarea codului

Această caracteristică rezidă în faptul că majoritatea aminoacizilor pot fi codificaţi de mai mulţi codoni structural diferiţi. Degenerarea codului este explicitată şi de non-ambiguitatea codonilor (Sittman, 1994), definită prin faptul că fiecare codon desemnează un aminoacid sau este un stop codon.

Degenerarea codului este evidenţiată de existenţa unor "*codoni sinonimi*" care au capacitatea de-a codifica mai mulţi aminoacizi (tabel 5-2). Existenţa codonilor sinonimi a condus la conceptul de "cod degenerat" care explicitează existenţa mai multor codoni pentru acelaşi aminoacid.

Faptul că există un număr de 64 codoni (luat din calculul $4^3 = 64$), mai mare comparativ cu numărul de 20 aminoacizi codificaţi, a condus la ideea existenţei unor "codoni sinonimi". In acest context luând în discuţie cazul aminoacidului Leu se poate constata că acesta este codificat de 6 codoni diferiţi, i.e.: UUA, UUG, CUU, CUC, CUA, CUG.

In codonii sinonimi se remarcă faptul că diferenţe majore în tripletul de nucleobaze apar în poziţia a 3-a, ceea ce nu influenţează fundamental translatarea informaţiei genice (e.g.: pentru aminoacizi ultima nucleobaza din codon poate fi ocupată de oricare din nucleobazele A, G, C, U).

Tabel 5-2. Degenerarea codului genetic.

Specificare		Aminoacizi	Total codoni
Codoni sinonimi (redare simetrică)	6	Leu; Ser; Arg	18
	4	Gly; Pro; Val; Thr	20
	3	Ile	3
	2	Phe; Tyr; Cys; His; Gln; Glu; Asn;	18
	1	Met; Trp	2
Codoni cu sens (suma codoni sinonimi)			61
Codoni nonsens			3
Total general codoni			64

Aspectul discutat mai sus pledează pentru faptul că degenerarea codului poate avea consecinţe importante asupra unor mutaţii apărute la nivelul DNA, care rămân fără efect deoarece prin înlocuirea unei baze se pot forma codoni sinonimi.

De asemenea, s-a constatat că degenerarea codului poate reduce în mare măsură consecinţele înlocuirii unor nucleobaze, deoarece o seamă de acizi aminaţi prezintă similitudini structurale. Spre exemplu, există codoni asemănători la aminoacizii monoaminodicarboxilici: GAU şi GAC - la acidul aspartic (Asp); GAA şi GAG - la acidul glutamic (Glu). Se remarcă faptul că aceştia diferă printr-o singură nucleobază.

f) Non-superpozabilitatea constituenţilor

Se explică prin existenţa unei continuităţi a secvenţei constituenţilor de tip ribonucleozidmonofosfat (simplificat nucleobaze). Această continuitate asigură în fapt non-superpozabilitate constituenţilor de tip rNMP. Astfel se constată faptul că la citirea unui codon se distinge un grupaj de trei ribonucleozidmonofosfaţi (identici sau diferiţi).

Această non-superpozabilitate în codonii adiacenţi (vicinali) prin secvenţa de ribomononucleozide constituente ale catenei de mRNA este menţionată în unele tratate mai vechi şi sub numele de "*cod fără acoperire*" după terminologia de limbă engleză "non-overlapping code", semnificând faptul că un ribomononucleotid nu aparţine concomitent la doi codoni adiacenţi.

5.3.4.3. Aparatul de translaţie

Caracteristicile codului genetic expuse mai sus, sunt importante atât pentru înţelegerea aspectelor structurale cât şi pentru explicitatea activităţii biologice, respectiv ale mecanismului de translaţie al informaţiei genice asigurată de aşa numitul "*aparat de translaţie*" existent la nivel celular.

Aparatul de translaţie - se constituie din: a) ribosomii celulari - ca formaţiuni ale infrastructurii celulare specifice translaţiei; b) bioconstituenţii ribosomali şi efectorii biochimici enzimatici care participă la translatarea informaţiei biologice conţinută în secvenţa ribonucleotidelor (ribonucleotidmonofosfaţilor) din catena de mRNA, într-o secvenţă de aminoacizi care vor forma noua catenă polipeptidică.

a) Ribosomii celulari

Ribosomii sunt formaţiuni specifice infrastructurii celulare prezente în citoplasmă, dispuse la nivelul reticulului endoplasmatic. Sub raport structural sunt formaţi din RNA ribosomal (rRNA) şi diferite proteine.

La nivelul ribosomilor celulari se produce sinteza proteică, aceştia asigurând iniţierea şi apoi participând la procesul de translaţie.

Cu referire la ribosomi se face menţiunea că astfel de formaţiuni, dar mai reduse ca mărime, se află în *plastide* şi *mitocondrii*. In cazul mitocondriilor, spre exemplu, există chiar acreditată notiunea de "mitoribosomi". Formaţiunile mitoribosomale sunt implicate în biosinteza unui număr restrâns de proteine de origine mitocondrială, care traversează (la eucariote) membrana mitocondrială, trecând în citoplasmă.

Progresele realizate în domeniul biologiei moleculare au relevat existenţa unor macromolecule de DNA cromosomal. Alături de acestea s-au izolat şi molecule mici de DNA care, evident, conţin un mesaj informaţional mai redus. Acestea se pot afla şi în afara cromosomului şi anume, în mitocondrii - DNA mitocondrial (mt-DNA) şi în plastide, mai exact în cloroplaste - DNA cloroplastic (ct-DNA) - v. Cap. 5.1.

Din punctul de vedere al biologiei moleculare şi al eredobiologiei există distincţia între diversele tipuri de DNA şi rolul biologic al acestora.

Astfel, DNA cromosomal asigură *ereditatea cromosomală* şi conferă reprezentabilitate genotipului. Alături de acestea în celulă poate exista DNA plastidal - prezent în plastide, mai mult în cloroplaste - DNA cloroplastic (ct-DNA) şi DNA mitocondrial (mt-DNA) - prezent în mitocondrii. Prezenţa acestor tipuri de DNA caracterizează *ereditatea extracromosomială* (denumită în tratate mai vechi şi "ereditate citoplasmatică").

b) Bioconstituenţi ribosomali şi efectori biochimici enzimatici

Principalul *bioconstituent* al ribosomilor este RNA ribosomal (rRNA). Acest tip de RNA - caracteristic ribosomilor - are masa moleculară de 500.000-1.500.000 Da şi reprezintă aproximativ 80% din RNA celular. In compoziţia rRNA se află nucleobazele specifice A, G, C, U şi unele nucleobaze rare (cu incidenţă redusă) metilate. Conformaţional este format din zone dublu helicale (cca 60%) alternate cu zone non-helicale (cca 40%), în

ansamblul său rRNA având o structură monocatenară. Intre bioconstituenţii cu rol în translaţie se menţionează şi ionii metalici dintre care Mg^{2+} are un rol esenţial.

Intre efectorii biochimici enzimatici se menţionează complexul de enzime activatoare, e.g.: aminoacil-tRNA sintetaza, peptid-sintetaza ş.a. Menţionare mai detailată a acestora se face la discuţia mecanismelor translaţiei.

Intr-o etapă preliminară, biosinteza proteinelor este precedată de o activare a aminoacizilor în cursul căreia intervine adenozintrifosfatul (ATP) formându-se iniţial un derivat de tipul aminoacil-AMP. Acesta evoluează spre un alt derivat care leagă o moleculă de tRNA purtătoare a unui aminoacid.

Această primă etapă este urmată de biosinteza protidelor, care se realizează în stadii succesive.

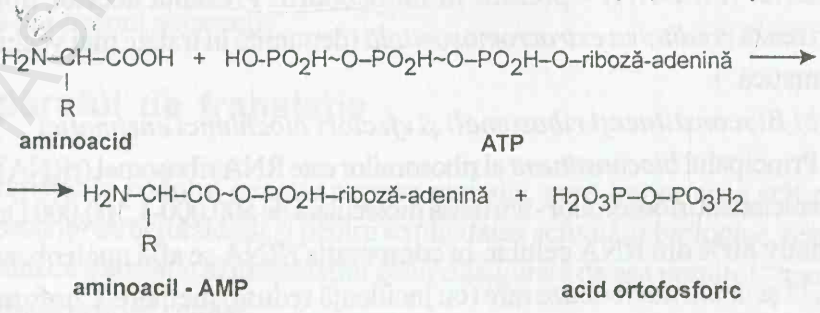
5.3.4.4. Activarea aminoacizilor

Activarea aminoacizilor reprezintă o etapă precursoare a biosintezei proteinelor. In această etapă componenţii necesari sintezei sunt:

- aminoacizii (AA);
- RNA de transfer (tRNA);
- aminoacil-tRNA sintetaza;
- ioni de Mg^{2+}.

Această etapă este caracterizată prin derularea a două subetape consecutive şi interdependente:

a) *prima subetapă* se defineşte prin interacţia dintre o moleculă de aminocid şi acidul adenozintrifosforic sau adenozintrifosfat (ATP). In cursul acestei etape un aminoacid oarecare (AA_i) intră în interacţie cu ATP formând (în cadrul unei reacţii reversibile) aminoacil-AMP (aminoacil-adenozinmonofosfatul) şi eliberând pirofosfatul (notat $H_2O_3P–O–PO_3H_2$ sau P_i-P_i sau $2P_i$). Deci:



In acest compus există o legătură specifică între gruparea carboxilică a AA şi gruparea fosforică din poziţia 5' a AMP-ului.

b) *secunda subetapă* este caracterizată prin interacţia dintre compusul Aminoacil-AMP şi o moleculă de "tRNA specific" pentru aminoacidul iniţial. In cursul acestei reacţii se formează aminoacil-tRNA şi se eliberează AMP. Reacţia este catalizată de un grup de enzime denumite "aminoacil-tRNA sintetaze", care au o mare specificitate de acţiune. Din acest considerent un aminoacid oarecare (AA_i) se leagă de un tRNA specific, e.g.: $tRNA^{AAi}$. In cazul concret al unor aminoacizi definiţi, spre exemplu Ala, Ser, Phe etc., exista $tRNA^{Ala}$, $tRNA^{Ser}$, $tRNA^{Phe}$ etc.

Reacţia (desfăşurată în prezenţa ionilor de Mg^{2+}, la modul general, se poate reda:

$$\text{Aminoacil–AMP} + \text{tRNA}^{AAi} \xrightarrow{Mg^{2+}} \text{Aminoacil–tRNA}^{AAi} + \text{AMP}$$

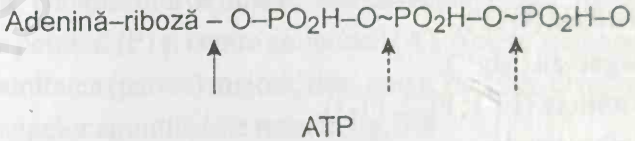
In general se cunoaşte faptul că în biosinteza DNA şi a proteinelor sunt implicaţi ioni de Mg^{2+}, dar şi ionii unor oligoelemente e.g.: Zn^{2+}, Cu^{2+}, Mn^{2+} - ca bioelemente (Gârban et al., 1993).

Aminoacizii sunt activaţi în citoplasma unde se află solubilizaţi. Legarea restului aminoacil (AA-) de tRNA specific se face printr-o legătură esterică între carboxilul aminoacidului şi hidroxilul de la C_2, sau C_3, al AMP terminal de la extremitatea cu codonul CCA a moleculei de tRNA. Legătura esterică menţionată este energogenă, astfel că la hidroliză poate elibera energie.

Valoarea acestei energii este dată de relaţia:

$$\Delta Go' = -29{,}26 \text{ KJ/mol } (-7 \text{ kcal/mol})$$

In condiţii de hidroliză ATP se scindează. Molecula de ATP care are o legatură microergică şi două legături macroergice:



prin scindare hidrolitică asigură o eliberare de energie care face posibilă formarea Aminoacil-$tRNA^{AAi}$. In această situaţie aminoacidul AA_i se poate lega de ribosomi pentru a participa la sinteza proteică.

In această circumstantă tRNA - în accepţia ipotezei emise de Crick - are calitatea de "*adaptor*" pentru integrarea AA_i în "aparatul de translaţie", mai exact integrarea în mecanismul biosintezei proteice.

5.3.4.5. Biosinteza proteinelor - stadii

Investigaţiile asupra biosintezei proteinelor au condus la accepţia existenţei a trei stadii caracteristice. In accepţia cunoştinţelor actuale se estimează că există următoarele stadii distincte:

A) Iniţierea biosintezei catenei polipeptidice;

B) Elongarea transcripţională a catenei;

C) Terminarea biosintezei şi eliberarea catenei.

Aceste stadii sunt importante pentru considerentul că asigură biosinteza proteinelor la nivel ribosomal. Stadiile biosintezei proteinelor se deosebesc atât prin natura biocon-stituenţilor şi efectorilor biochimici (de tip enzimatic) cât şi prin caracteristicile produşilor formaţi. In continuare se vor prezenta, succint, date privitoare la stadiile specfice biosintezei proteinelor.

A. Iniţierea biosintezei catenei polipeptidice

Primul stadiu al biosintezei proteinelor se realizează la nivelul ribosomilor. Aceştia participă atât sub forma "asociată", deci de poliribosomi cu constanta de sedimentare (S_{20W}) de 70 S la procariote şi 80S la eucariote, cât şi sub formele disociate cu S_{20W} de 30 S şi 50 S la procariote, respectiv 40 S şi 60 S la eucariote.

In acest stadiu al biosintezei proteice componenţii necesari sunt:

- aminoacil-tRNA (i.e.: AA_i-CO-tRNA) - compus iniţiator în cazul eucariotelor (incluzând restul unui aminoacid oarecare: AA_i); formil-metioninil- tRNA în cazul procariotelor (incluzând restul metioninei Met-CO- scris uzual prin Met-);
- acidul RNA - mesager (mRNA);
- guanozintrifosfat (GTP);
- ionii de magneziu (Mg^{2+});
- factori de iniţiere (FI-1; FI-2: FI-3);
- subunităţi ribosomale.

Studiile efectuate pe procariote - mai exact pe bacteria E. coli -au relevat particularităţile acestui stadiu. Astfel, iniţierea biosintezei la catena polipeptidică începe la capătul N-terminal al catenei şi vizează aminoacidul metionina (Met) care are codonul start

AUG. Transportul se realizează prin: aminoacidul $tRNA_{Met}$, iar compusul format este:

metioninil-tRNA notat adesea prin *Met-tRNA*

In interacţiile caracteristice "iniţierii" biosintezei Met-tRNA este formilată, devenind precursorul "*formil-metioninei activate*". Formilarea are loc sub acţiunea acidului N_{10}-formiltetrahidrofolic (notat prin N_{10}-formil-FH_4). Reacţia care porneşte de la metionină (Met) şi conduce la N- formilmetionină (N-formil-Met) se poate reprezenta astfel:

$$\text{Met} \xrightarrow[-\ \text{Met–tRNA} + FH_4]{+\ N_{10}\text{–formil–}TH_4} \text{N–formil–Met}$$

In urma reacţiei N_{10}-formil-FH_4 se descompune rezultând metioninil-tRNA notat (Met-tRNA, va elibera formil-Met-tRNA şi acidul tetrahidrofolic (FH_4). Reacţia se poate reda astfel:

$$N_{10}\text{ - formil - }FH_4 + \text{Met - tRNA} \longrightarrow \text{Formil - Met - tRNA} + FH_4$$

Consecutiv etapei de iniţiere gruparea formil din "formil-metionina activată" este eliminată în prezenţa unor formil-enzime specifice.

In cazul unor molecule proteice sub acţiunea unor aminopeptidaze este eliminată şi Met din zona N-terminală a catenei. Astfel zona N-terminală a catenei poate începe cu un aminoacid oarecare în loc de Met.

Studii efectuate pe E. coli au arătat că pentru iniţierea unei molecule proteice este necesară formarea unui "*complex de iniţiere*", fapt care implică disocierea ribosomilor 70 S în subunităţi (părţi) ribosomale specifice distincte prin constanta de sedimentare (S_{W20}) c.s. 30 S şi c.s. cu 50 S.

Formarea "complexului de iniţiere" este condiţionată de existenţa a două semizone denumite: centre peptidil (P) şi centre aminoacil (A). Aceste semizone ribosomale sunt localizate în subunitatea (partea) majoră, deci cu c.s. de 50 S. O reprezentare crochiu al dispoziţiei semizonelor amintite este redat în fig. 5-8.

Efectul de iniţiere este tributar coparticipării a trei factori de iniţiere (FI) notaţi astfel: FI-1; FI-2; FI-3. Rolul acestor factori presupune o succesiune de efecte etapizate astfel:

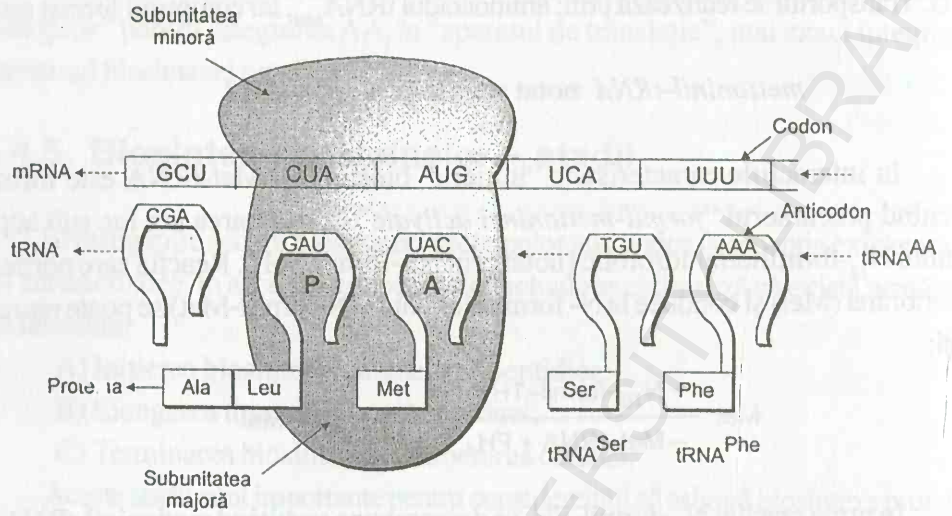


Fig. 5-8. Centre semizonale active la ribosom - localizate în subunitatea majoră
A) Centrul aminoacil; B) Centrul peptidil

- factorul FI-3 se fixează pe subunitatea ribosomală cu c.s. de 30 S, fiind "primum movens" în inițierea interacțiilor specifice inițierii;
- factorul FI-2 participă la formarea complexului formil-Met- RNA pe centrul P din subunitatea ribosomală 30 S. Se face remarca faptului că pe centrul P se face, ino tempore, legarea resturilor peptidil pe măsura formării acestora;
- factorul FI-1 intervine în cursul legării mRNA de subunitatea 30 S. Acesta este momentul când se realizează şi asamblarea cu subunitatea ribosomală 50 S, eliberându-se în acest mod factorii de inițiere. In această situație intervine guanozintrifosfatul GTP şi ionii de Mg^{2+}. Molecula de GTP eliberează o moleculă de fosfat (P_i), deci este un proces energogen (se eliberează energia ΔE):

$$GTP \xrightarrow{\Delta E} GDP + Pi$$

Sinteza propriu zisă a catenei polipeptidice se realizează pe "*centrul aminoacil(A)*" din subunitatea cu S_{W20} de 30 S, legându-se "step by step" (pas cu pas) câte o nouă moleculă de *aminoacil-tRNA*.

In această situație molecula de mRNA se dispun în proximitatea codonului start AUG care este complementar anticodonului corespunzator (UAC) din formil-Met-tRNA.

Legarea într-o anumită secvenţă a aminoacizilor actionaţi - la nivelul ribozomilor - este condiţionataă de succesiunea codonilor din molecule de mRNA.

B. Elongarea transcripţională a catenei polipeptidice

Aceasta reprezintă stadiul secund al biosintezei proteinelor. In cursul acesteia are loc o continuă "reaşezare" în relaţia biunivocă ribosom - mRNA. Aceasta a fost explicată prin deplasarea ribosomului de-a lungul mRNA astfel încât se realizează "legarea" complexului AA_i-CO-tRNA (deci aminoacil- tRNA) cu anticodonul corespunzător.

Stadiul este realizabil în condiţiile prezenţei anumitor componenţi, aceştia fiind:

- AAi-CO-tRNA (aminoacil-tRNA) specific pentru codon;
- guanozintrifosfat (GTP);
- ioni de magneziu (Mg^{2+});
- factori de elongare (FE) notaţi prin abrevierile T şi G, i.e.: factorii de elongare FE-T şi FE-G;
- peptid-sintetază.

Legătura peptidică (-CO-NH-) dintre resturile de aminoacizi (-AA-) se formează sub acţiunea unei enzime denumite "**peptid-sintetază**", care este activă în subunitatea ribosomală majoră (e.g.: 50 S la procariote, 60 S la eucariote).

Elongarea catenei polipeptidice este tributară aşa numiţilor "factori de elongare" (FE) de tip T şi G a căror compoziţie nu este elucidată.

Acest stadiu al sintezei este definit prin mai multe momente distincte:

a) activarea este caracterizată prin intrarea în acţiune a centrilor din ribosomi, i.e.: aminoacil (centrul A) şi peptidil (centrul P). Astfel, în:

- centrul A din ribosom este o moleculă de tRNA de care se află legat un tRNA care transportă un rest acilat al unui aminoacid (AA_i), notat abreviat AAi-CO-. Intr-un caz concret, spre exemplu al treoninei (Tre) restul aminoacil este

Tre - CO - tRNA

rest treonil

Intre tRNA care transportă restul acilat şi mRNA se realizează o legătură prin anticodonul corespunzător.

- centrul P al ribosomului se află o moleculă de tRNA care poartă un rest peptidil cu ultimul aminoacid eliberat din etapa de biosinteză, e.g.:

Tyr - Val - Glu - Lys - Ala - tRNA

rest peptidil

b) transferarea - se defineşte prin deplasarea restului acilat din "centrul C" - este caracterizată prin sinteza peptidică propriu zisă în care are loc transferul restului: H_2N-AA_i-CO-tRNA pe restul peptidil -CO-tRNA.Acest moment se consumă doar în prezenţa unei enzime specifice - peptid-sintetaza ribosomală.

c) translocarea I - este caracterizată prin deplasarea restului peptidil din "centrul P" la nivelul căruia se află ultimul rest de aminoacid (în cazul exemplificat-Ala) din restul peptidil.

Acest moment este caracterizat de translocarea catenei peptidice la nivelul "centrului P". In această subetapă intervine factorul de elongare G (i.e.: FE-G şi o moleculă de GTP). Prin translocare se produce eliberarea "centrului A" pentru continuarea biosintezei.

d) translocarea II - este declanşată în momentul eliberării "centrului A". La nivelul acestuia se poate lega un nou aminoacil-tRNA, e.g.: H_2N-AA_i-CO-tRNA al cărui codon corespunde proximului codon din mRNA.

Momentul acesta este catalizat de un factor de elongare FE-T şi presupune participarea unei alte molecule de GTP.

Deci, se poate conchide că în subetapele de "translocare" în care se "ocupă" şi se "eliberează" "centrul P" şi "centrul C", intervin două molecule de GTP. Rolul acestora se consideră că este energogen (prin eliberarea unei molecule de fosfat P_i).

Din punctul de vedere al formării legăturilor peptidice (-CO-NH-) se poate conchide că acestea nu necesită energie deoarece existenţa resturilor de tip "peptidil", respectiv "aminoacil" demonstrează că moleculele de aminoacid sunt deja activate.

Biosinteza moleculelor polipeptidice se continuă în maniera descrisă, fiind limitată (oprită) de apariţia unuia din codonii "stop".

Catena polipeptidică eliberată în mediul intracelular va intra în procesele metabolice generând holo- sau heteroproteine, în funcţie de mesajul genetic pe care l-au preluat.

C. Terminarea biosintezei şi eliberarea catenei

Catena unei macromolecule de mRNA are, în mod normal, un "codon terminal" sau "codon stop", notate uzual prin TER sau STOP. Aceşti codoni sunt UAA, UAG, UGA şi facilitează terminarea translaţiei.

In stadiul terminal al biosintezei catenei polipeptidice, constituenţii prezenţi sunt:

- codonii de tip "terminal" sau "stop"
- factorul de eliberare ribosomal, denumit "factorul R"

Prezenţa acestora este indispensabilă derulării ultimului stadiu al biosintezei. Astfel, codonii TER (sau STOP) opresc procesul de biosinteză a lanţului polipeptidic.

Aceşti codoni, în tratatele de Genetică şi de Biochimie mai vechi, sunt cunoscuţi şi sub alte denumiri, i.e.: UAA - Ochre; UAG - Amber şi UGA - Umber.

Factorii de eliberare ribosomali (factori R) intervin în "eliberarea" polipeptidei nou sintetizate producând scindarea legăturii covalente esterice dintre restul peptidil şi tRNA - al ultimului rest de aminoacid din catenă. In această etapă finală ribosomul eucariot (70 S) sau eucariot (80 S) este eliberat reconstituindu-se structurile specifice pentru a reintra într-un nou proces de biosinteză).

5.3.4.6. Energogeneza si reglarea biosintezei proteinelor

Existenţa a patru etape în biosinteza proteinelor asigură translatarea informaţiei implicând metabolismul material, dar şi metabolismul energetic. In acest fel informaţia prezentă iniţial sub forma unei anumite secvenţe a deoxiribonucleotidelor din molecula de DNA spre o anumită secvenţă a ribonucleotidelor din RNA şi în final o secvenţa corespunzătoare a aminoacozilor care va defini molecula polipeptidică.

La acest proces - aşa cum s-a arătat - participă o moleculă de ATP şi două molecule de GTP pentru fiecare legătură peptidică apărută în procesul de biosinteză. Energia liberă asigurată de aceste trei molecule este:

$$\Delta Go' = 29{,}26 \times 3 = -87{,}78 \text{ kJ/mol}$$

$$\Delta Go' = -7{,}00 \times 3 = -21{,}00 \text{ kJ/mol}$$

Din calcule s-a constatat că energia liberă a unei legături peptidice corespunde valorii:

$$\Delta Go' = 20{,}9 \text{ kJ/mol (aprox. - 5 Kcal/mol)}$$

Din aceste date s-a conchis că procesul de biosinteză a proteinelor necesită un excedent de energie, în raport cu sinteza chimică. Acest fapt a fost explicat prin particularităţile topochimice şi bioenergetice datorate nivelelor de structură ale moleculelor proteice.

Biosinteza proteinelor asigură "colinearitatea genă- proteină" şi este supusă unor mecanisme de reglare. Procesul de reglare nu este apanajul exclusiv al "*ribosomilor liberi*" şi/sau a "*poliribosomilor*" prezenţi la nivelul reticulului endoplasmatic. In cazul formaţiunilor mai sus menţionate se relevă faptul că un ribosom asigură şi biosinteza unei catene polipeptidice, iar un poliribosom (agregat ribosomal) poate contribui la sinteza unor molecule mai complexe şi cu o eficienţă crescută (organizarea "agregatelor" ribosomale explicitează faptul că în celulă mRNA reprezintă doar 1-2 %, din RNA total).

Progresele realizate în domeniul biologiei moleculare au arătat că există şi organite celulare (i.e.: mitocondrii, plastide) care, sub raport morfofuncţional şi topobiochimic, pot asigura biosinteza de proteine. Astfel, în organitele celulare menţionate mai sus exista întreaga pleiadă de constituenţi şi efectori biochimici, e.g.: DNA, mRNA, tRNA, enzime specifice

ş.a., necesare biosintezei proteice. Există chiar fractiuni specifice, la nivelul mitocondriilor (i.e.: mitoribosomii) şi cloroplastelor care concură la procesul de biosinteză.

Evident cuantumul proteinelor a căror biosinteză are loc la nivelul organitelor celulare este redus, dar acestea sunt importante în asigurarea relaţiei structură chimică - activitate biologică la nivelul ultrastructurilor intracitoplasmatice.

In contextul biosintezei proteinelor se impune menţinerea existenţei unui *mecanism de reglare* la baza căruia se află controlul genetic. Se exemplifică în acest sens modificarea cuantumului enzimelor în scopul asigurării unei funcţionalităţi normale în relaţia mediu intern-mediu extern. Cercetări în acest domeniu efectuate de Jacob şi Monod (1961) pe E. coli au condus la elaborarea conceptelor privitoare la mecanismul biosintezei proteinelor pornind de la codul genetic.

Studii asupra microorganismelor au arătat că existenţa în mediul de cultură a anumitor substanţe în concentraţii crescute, conduce la activarea biosintezei enzimelor care intervin la biosinteza proteinelor - fenomen cunoscut sub numele de *inducţie enzimatică*. Similar, în cazul existenţei în celulă (în speţa microorganism) a unor concentraţii mari dintr-un anumit metabolit determină inhibiţia biosintezei enzimelor care participă la formarea metabolitului respectiv - cunoscut sub numele de *represie enzimatică*.

Cercetări mai aprofundate asupra fenomenelor menţionate mai sus au arătat că în biosinteza enzimelor există, de fapt, mecanisme specifice represiei şi depresiei enzimatice. In această accepţie, depresia - estimată iniţial ca un fenomen de inducţie enzimatică - este receptată ca un fenomen de suprimare a represiei.

Colinearitatea genă-proteină discutată la acest subcapitol, alături de energogeneză şi mecanismele de reglare, completează datele referitoare la sinteza proteinelor.

In terminologia utilizată în ultimii ani - pentru a explicita transmiterea informaţiei biologice de la genă spre proteină - există accepţia termenului de "*colinearitate genă-proteină*".

Aceasta de fapt reiterează ideea că produsul unei anumite gene este o peptidă specifică caracterizată printr-o secvenţă care exprimă regiunile genei.

La *procariote* tentativele de testare genetică de înaltă rezoluţie au stabilit existenţa unei relaţii lineare între secvenţa nucleobazelor (de fapt a deoxiribonucleotidelor) din genă şi secvenţa acizilor aminaţi din peptidele produse.

La *eucariote* colinearitatea secvenţelor de nucleobaze şi secvenţelor de acizi aminaţi din peptidele produse există de asemenea. Evaluarea "colinearităţii" este mai complexă pentru considerentul că proteinele structurale, care definesc fenotipul în totalitatea sa, prezintă o mare diversitate. Acestea au o dispunere intracelulară (e.g.: enzime, hemoglobină, colagenul etc) sau extracelulară (e.g.: receptorii membranari, matricea extracelulară etc.). De asemenea, pot exista proteine circulante (e.g.: albumine, globuline etc).

6. INVESTIGAREA ACIZILOR NUCLEICI

6.1. CONSIDERATII GENERALE

În biologia moleculară se folosesc metode cu aplicabilitate în investigaţiile asupra DNA, e.g.: studiul genomului; izolarea şi cercetarea genelor; evaluarea expresiei genice, etc. Aceste metode se bazează pe tehnici performante de investigare analitică cunoscute sub denumirea generică de "metode specifice". Elaborarea metodelor specifice biologiei moleculare s-a făcut pe baza conceptelor fundamentale şi a aplicaţiilor în laborator ale biologiei celulare, biochimiei şi chimiei analitice (calitative şi cantitative). Suportul teoretic şi aplicativ al acestor metode este reprezentat de metodele analitice clasice, i.e.: metode chimice (directe) şi metode fizico-chimice sau instrumentale (indirecte).

Modul de operare (i.e. tehnica de lucru) şi aparatura performantă necesară aplicării metodelor specifice biologiei moleculare, a făcut ca aceste metode să fie considerate "tehnici analitice majore" (Sittman, 1994).

Intre metodele specifice utilizate în prezent - majoritatea descoperite şi/sau perfecţionate după anul 1975 - cu aplicabilitate în investigarea acizilor nucleici, se menţionează: secvenţializarea; hibridizarea; detectarea prin sonde moleculare; determinarea de fragmentelor de acizi nucleici; amplificarea prin reacţia în lanţ a polimerazei (PCR); evaluarea polimorfismului lungimii fragmentului de restricţie (RFLP).

O succintă prezentare a metodelor specifice biologiei moleculare, cu menţionarea particularităţilor analitice, se face în continuare:

1. *Metode de secvenţializare* - cu ajutorul cărora se determină succesiunea nucleotidelor din fragmente moleculare de acizi nucleici, i.e. DNA şi/sau RNA (Wilson

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

şi Thomas, 1974; Sanger, 1975; Sanger et al., 1977; Wu, 1978). Între acestea se menţionează:

a) metoda Maxam - Gilbert (1977) utilizată pentru "secţionarea" specifică a DNA la nivelul unui singur tip de nucleobază,

b) metoda Sanger-Nicklen-Coulsen (1977) care se pretează studiului moleculelor de DNA obţinute prin sinteză chimică. In această metodă se folosesc derivaţi de tipul dideoxinucleozidtrifosfaţilor (care conţin 2', 3' - dideoxiriboza), notaţi uzual prin ddNTP.

2. *Metoda de hibridizare* - prin care devine posibilă legarea monocatenelor de DNA şi RNA, rezultând dicatene identice (DNA-DNA) sau diferite (DNA-RNA). Hibridizarea poate fi: intraspecifică - între indivizii din aceiaşi specie (plantă sau animal) şi interspecifică - între indivizi din specii diferite.

3. *Metoda de detectare prin sonde moleculare* - se pretează identificării clonelor care conţin genele izolabile dintr-o "bibliotecă de DNA", constituită din fragmente de DNA. Sondele asigură specificitatea de fragment pentru identificare. În mod curent se utilizează:

a) sonde moleculare calde - radiomarcate

b) sonde moleculare reci - chimiomarcate

4. *Metode de determinare a fragmentelor de acizi nucleici* - care sunt importante pentru identificarea DNA din genele codante pentru proteine sau pentru cuantificarea mRNA din ţesuturi. In laborator se folosesc în mod curent două metode care prezintă anumite similitudini:

a) metoda Southern (Southern blot analysis) - permite determinarea secvenţelor specifice dintr-un fragment de DNA (Southern, 1977)

b) metoda Northern (Northern blot analysis) - se pretează decelării fragmentelor din molecula de mRNA (Alwine et al., 1977).

5. *Metoda amplificării prin reacţia în lanţ a polimerazei* - PCR (Polymerase Chain Reaction) -permite amplificarea moleculei de DNA În cadrul unor cicluri de sinteză repetitive, realizate in vitro. În acest scop se utilizează molecule de DNA scurte denumite "amorse" sau "primeri".

6. *Metoda evaluării polimorfismului lungimii fragmentului de restricţie* - RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism) - se pretează pentru investigarea moleculelor de DNA, contându-se pe faptul că există posibilitatea realizării unui cuplu de tip sondă moleculară/enzimă de restricţie

În continuare se vor prezenta mai detaliat metodele specifice biologiei moleculare,

BUCHAREST UNIVERSITY LIBRARY

care şi-au aflat utilizarea în diagnostic, medicina legală, chimia judiciară, patologia biochimică, eredobiologie etc.

Pentru informaţii suplimentare referitoare la metodele specifice biologiei moleculare, precum şi a metodelor generale aplicate în investigaţiile din domeniul biochimiei şi al fizico-chimiei, care sunt adjuvante în biologia moleculară, există o vastă literatură de specialitate (Avery et al., 1944; Baltimore, 1970; Termin şi Mizutani, 1970; Hood, 1975; Possingham şi Rose, 1976; Cohn, 1979; Cantor şi Schimmel, 1980, Gershoni şi Palade, 1982; Popa şi Repanovici, 1982; Alberts et al., 1983; Emery, 1984; Benga, 1985; Darnell et al., 1986; Zarnea, 1986; Kruh, 1987; Watson et al., 1995; Jaenisch, 1988; Kaplan şi Delpech, 1990; Cajal, 1990; Baak, 1991; Gârban, 1992; Griffiths et al., 1993; Davidson şi Sittman, 1994; Kaufman et al., 1995).

6.2. METODE DE DETERMINARE A SECVENTELOR DIN MOLECULE DE ACIZI NUCLEICI

6.2.1. PRIVIRE SINOPTICA

La acizii nucleici se poate realiza secvenţializarea (secvenţierea) prin metode specifice biologiei moleculare. Secvenţializarea rezidă în determinarea succesiunii nucleotidelor din constituţia biomacromoleculelor de DNA şi/sau RNA (Wu, 1978; Maniatis et al., 1982; Alberts et al., 1983; Sittman, 1994; Neidle, 1998).

Aplicarea acestei metode vizează macromoleculele şi/sau fragmentele macromoleculare de DNA dublu catenar (DNA dc) şi monocatenar (DNA mc), de RNA monocatenar (RNA mc). Se poate astfel studia genomul celular şi viral prin "secţionarea" macromoleculelor constituiente (Darnell et al., 1986; Cajal, 1990).

În acest context se reaminteşte faptul că existenţa structurii monocatenare la DNA a fost remarcată încă din 1959 de către Sinsheimer (investigaţii efectuate pe bacteriofagi).

Metoda se pretează şi pentru studiul fragmentelor macromoleculare obţinute prin sinteza realizată prin procedee specifice chimiei organice.

Caracterul *polianionic* al acizilor nucleici permite migrarea electroforetică a acestora în gel de agaroză sau poliacrilamidă. Viteza de migrare este invers proporţională cu mărimea fragmentului molecular (deci cu lungimea catenei). Dat fiind caracterul polianionic, migrarea fragmentelor se produce spre catod (cataforeză), iar fragmentele - de dimensiuni inegale - se vor separa În fracţiuni (fig.6-1). Fracţiunile mai apropiate de

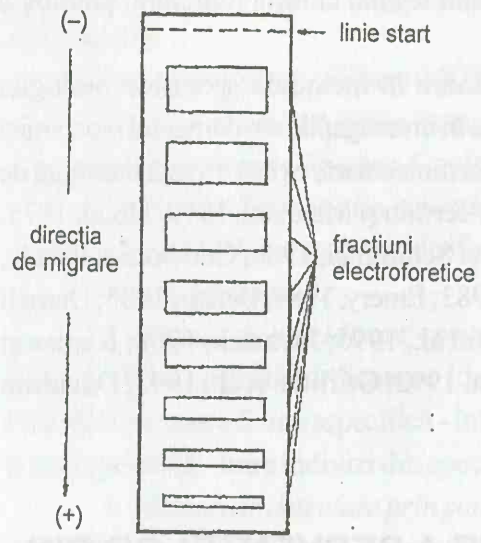


Fig. 6-1. Electroforegrama separării

catod, deci migrate cu viteză mai mare, provin din fragmente mai scurte (i.e. cu masa moleculară mai redusă)

Electroforeza este precedată de legarea la extremităţiile 5'-terminale de la fiecare fragment (catenă) a unui rest fosfat care conţine ^{32}P. În acest rest se află dDNA radioactiv, notat [^{32}P] dDNA. Legarea se face în prezenţa enzimei polinucleotid kinaza.

Aplicativ, spre exemplu, prin utilizarea enzimelor de restricţie (ER) este posibilă "secţionarea" macromoleculelor DNA într-un număr mare, dar limitat, de fragmente. Secvenţializarea frag-mentelor este fezabilă - în continuare - prin metoda electroforezei.

Similar, aşa cum s-a arătat, se poate proceda şi în cazul secvenţializării fragmentelor de DNA obţinute prin sinteză organică.

Dintre metodele de secvenţializare a DNA s-au impus predilect două : metoda Maxam-Gilbert şi metoda Sanger-Nicklen-Coulsen. Date generale asupra acestor metode se prezintă în continuare.

6.2.2. METODA MAXAM-GILBERT

Metoda se bazează pe posibilitatea de-a produce o "incizie catenară specifică" în macromolecula de DNA la nivelul unui singur tip de nucleobaze (A,T,G sau C). Incizia catenară specifică este cunoscută şi sub numele de "*secţionare*" sau "*clivare*". Elaborarea acestei metode de incizie (secţionare) catenară chimică a DNA s-a făcut în 1977 de Allan Maxam şi Walter Gilbert de la Universitatea Harvard (U.S.A.).

În cursul secţionării se produc modificări chimice caracteristice pentru fiecare deoxiribonucleozidmonofosfat (dNMP). S-au elaborat, în acest scop, procedee specifice de depurinizare şi depirimidinizare prin care se realizează fragmentări la nivelul deoxiribonucleozidfosfaţilor cu nucleobaze purinice A, G (i.e.: dAMP şi dGMP), respectiv a acelora cu nucleobaze pirimidinice C, T (i.e.: dCMP şi dTMP). Asfel, în final se obţin patru tipuri de fragmente catenare cu secţionare la nivelul nucleobazelor C, T, A şi G.

Acestea se separă electroforetic şi apoi sunt supuse autoradiografierii. In final se evaluează secvenţele catenare În funcţie de nucleobaze.

În fig.6-2 se exemplifică aspectul secvenţelor unui fragment de DNA care conţine 33 deoxiribonucleotide - aplicarea metodei Maxam-Gilbert.

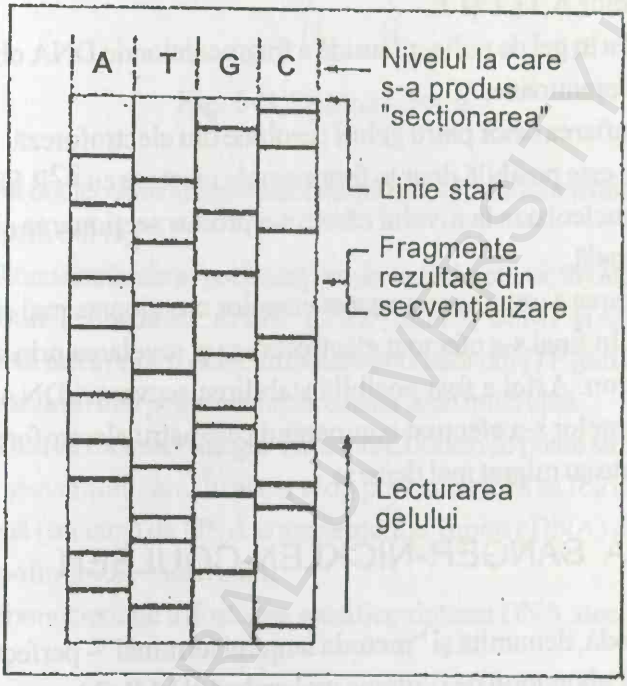


Fig.6-2. Secvenţializarea unui fragment de acid deoxiribonucleic nativ după incizia catenară specifică cu ajutorul unei enzime de restricţie (Gârban, 1992)

Aplicarea acestei metode presupune o etapizare a modului de operare care poate fi redată schematic după cum urmează:

a) incizia catenară specifică macromoleculei DNA, în mai multe fragmente cu ajutorul unei enzime de restricţie (ER);

b) separarea şi purificarea fragmentelor de DNA obţinute, rezultând aşa numita "bibliotecă de DNA";

c) fixarea la extremitatea 5 '- terminală, de la fiecare fragment - a unui rest fosfat marcat cu ajutorul [^{32}P] dATP în prezenţa polinucleotid-kinazei;

d) separarea catenelor de DNA prin tratare chimică alcalină;

e) separarea soluţiei care conţine catene de la DNA în patru enşantioane;

f) utilizarea unor procedee specifice de secţionare pentru fiecare eşantion, utilizând agenţi chimici diferiţi;

g) obţinerea a patru tipuri de fragmente catenare incizate specific la nivelul nucleobazelor A, G, Cşi T;

h) electroforeza în gel de poliacrilamidă a fragmentelor de DNA obţinute în cadrul celor patru eşantioane;

i) autoradiografierea celor patru geluri rezultate din electroforeză.

Vizualizarea este posibilă doar la fragmentele marcate cu ^{32}P. Fiecare fragment de DNA începe cu nucleobaza la nivelul căreia s-a produs secţionarea şi se sfârşeşte cu extremitatea 5'-terminală.

Secvenţializarea a impus parcurgerea etapelor menţionate mai sus, lucrându-se cu patru eşantioane. În final s-a efectuat electroforeza şi revelarea prin autoradiografie pentru fiecare eşantion. Asfel a fost posibilă stabilirea secvenţei DNA luat în studiu. Determinarea secvenţelor s-a efectuat comparând cele patru electroforegrame, în care fragmentele mai scurte au migrat mai departe.

6.2.3. METODA SANGER-NICKLEN-COULSEN

Această metodă, denumită şi "metoda lanţului terminal" - perfectată în 1977 de Fred Sanger et al. (în Laboratorul de Biologie moleculară al M.R.C.) - se pretează utilizării în Biologia moleculară pentru DNA obţinut prin sinteza chimică organică.

Pentru realizarea sintezei este necesară prezenţa a două grupe de compuşi (precursori):

1) patru deoxiribonucleotide trifosfatate, notate prin dNTP;

2) patru dideoxiribonucleotide trifosfatate corespunzătoare, notate prin ddNT

In ambele grupe de compuşi N este una din nucleobazele A, T, G, C. Astfel pentru dNTP corespund compuşii:

dATP, dTTP, dGTP, dCTP,

iar pentru ddNTP s-au sintetizat compuşii:

ddATP, ddTTP, ddGTP, ddCTP

În compoziţia dideoxiribonucleotidelor se află, În locul deoxiribozei un analog al acesteia - dideoxiriboza (2, 3 - dideoxiriboza). Acest compus, spre deosebire de deoxiriboză, nu are - OH în poziţia $C_{2'}$ şi $C_{3'}$ (Fig.6-3).

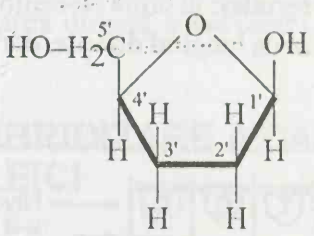


Fig. 6-3. Dideoxiriboza

Analogul nucleotidic în acest caz este un dideoxiribonucleotid trifosfat notat, după cum s-a arătat, prin ddNTP.

Deoxiribonucleotidele se pot încorpora, în cadrul sintezei, în catena DNA care conține deoxiribonucleotidele obișnuite: dAMP, dTMP, dGMP, dCMP și este în curs de creștere (elongare). În cazul încorporării dideoxiribonucleotidelor ddNTP (din care evident rămân în lanț ddNMP) sinteza nu mai poate continua, catena fiind întreruptă.

Prin utilizarea metodei Sanger-Nicklen-Coulsen se poate sintetiza lanțul de DNA care dorim să-l secvențializăm. În acest scop pentru sinteză se folosesc:

1) o catenă (un lanț) de DNA complementar (notat cDNA) cu rol de matrice;
2) DNA polimeraza bacteriană;
3) deoxiribonucleotide trifosfatate specifice sintezei DNA, deci: dATP, dTTP, dGTP, dCTP;
4) o cantitate redusă din dideoxiribonucleotidele trifosfatate analoage, deci ddATP, ddTTP, ddGTP și ddCTP (cu conotația generală ddNTP).

Din reacția de sinteză rezultă fragmente de DNA de patru tipuri diferite (condiționat de ddNTP).

În exemplul din fig.6-4 se redă cazul unui fragment de DNA sintetizat, în care există 17 nucleotide cu secvența:

ATCG/TAGA/CTAG/CTCA/T

Pentru determinarea secvențelor din fragmentele de DNA se procedează, ca și în cazul metodei precedente, evident în etape specifice, cum ar fi:

a) fixarea la extremitatea 5'-terminală de la fiecare fragment de DNA a unui rest fosfat marcat cu ajutorul [^{32}P] dATP În prezența polinucleotid-kinazei;
b) electroforeza fragmentelor de DNA aparținând acelor patru tipuri;

BCU IASI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

c) autoradiografia gelurilor rezultate în urma electroforezei;

d) identificarea fragmentelor de lungimi diferite, dar toate terminate prin acelaşi deoxiribonucleotid.

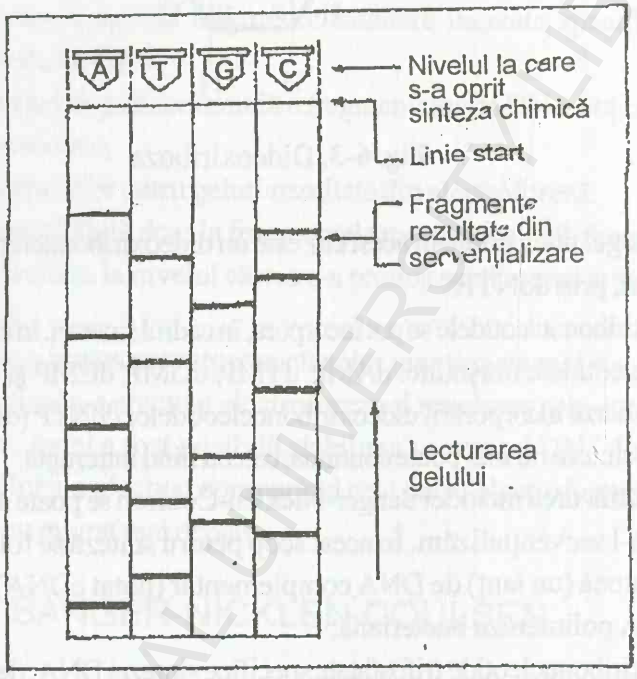


Fig. 6-4. Secvenţializarea unui fragment de acid deoxiribonucleic rezultat prin sinteza chimică organică (Gârban, 1992)

Pentru realizarea sintezelor se poate folosi o amorsă nucleotidică marcată cu ^{32}P. Fragmentele sunt supuse electroforezei care este efectuată pe patru eşantioane. Aceasta este urmată de autoradiografie, ca şi în cazul metodei precedente. Astfel, se ajunge la obţinerea secvenţelor de deoxiribonucleotide din fragmentele de DNA radioactivate rezultate prin electroforeză.

Există şi posibilitatea utilizării reverstranscriptazei care poate asigura sinteza cDNA (DNA complementar) pornind de la mRNA (RNA mesager). Apoi se secvenţializează cDNA şi se deduce - prin codul genetic - secvenţa de proteine codate de mRNA.

Aplicarea acestei metode - bazată pe conceptele biologiei moleculare - este mult mai rapidă decât determinarea directă a secvenţei aminoacizilor dintr-o catenă polipeptidică.

6.3. METODE DE HIBRIDIZARE A CATENELOR DE ACIZI NUCLEICI

6.3.1. PRIVIRE SINOPTICĂ

Hibridizarea (lat. hibrida - metiş) în biologia moleculară este concepută ca o metodă de disociere şi fragmentare a catenelor de dc-DNA şi de asociere între două catene diferite de mc-DNA sau între o catenă de mc-DNA şi una de mc-RNA, cu condiţia de complementaritate a acestora.

Fragmentele de acizi nucleici participante la asociere (mc-DNA sau mc-RNA) pot aparţine unui individ din aceeaşi specie de plantă sau animal - *hibridizarea intraspecifică* sau pot aparţine unor indivizi din specii diferite - *hibridizarea interspecifică.*

Metoda de hibridizare rezidă în interrelaţia dintre două fragmente monocatenare de acizi nucleici urmată de legarea acestora şi constituirea unei structuri dicatenare stabile.

În biologia moleculară, în biochimia acizilor nucleici şi în genetică pentru explicitarea problemelor legate de hibridizare, dar şi de recombinare genică, se folosesc, de asemenea, noţiunile antitetice de *denaturare-renaturare*. Alături de acestea, aşa cum s-a arătat mai sus, în domeniul hibridizării se mai utilizează şi noţiunile de *discociere-asociere*.

Denaturarea şi renaturarea se întâlnesc în procesele de replicaţie şi de transcripţie. Aceste procese stau şi la baza studiului expresiei genelor în relaţia genotip-fenotip.

6.3.2. TIPURI DE HIBRIDIZARE

Pentru realizarea hibridizării este necesară homologia monocatenelor, caracterizată prin complementaritatea secvenţelor de nucleobaze. Hibridizarea se poate produce între monocatene *de acelaşi tip*, e.g.: mc-DNA (Ia) şi mc-DNA (Ib) - rezultate prin denaturarea unei molecule de dc-DNA de la acelaşi organism; mc-DNA (I) şi mc-DNA (II) - rezultate de la organisme diferite, precum şi între monocatene *de tip mixt*, i.e. mc-DNA şi mc-RNA.

Se remarcă astfel că tipurile de hibridizare existente sunt dependente de natura monocatenelor participante la interacţie. In fig. 6-5 se exemplifică câteva interacţii care conduc la hibridizare sau non-hibridizare.

Homologia dovedeşte fie existenţa unei provenienţe comune a catenelor macromoleculare (dc-DNA iniţial), fie existenţa unei "interrelaţii de matrice" în cadrul

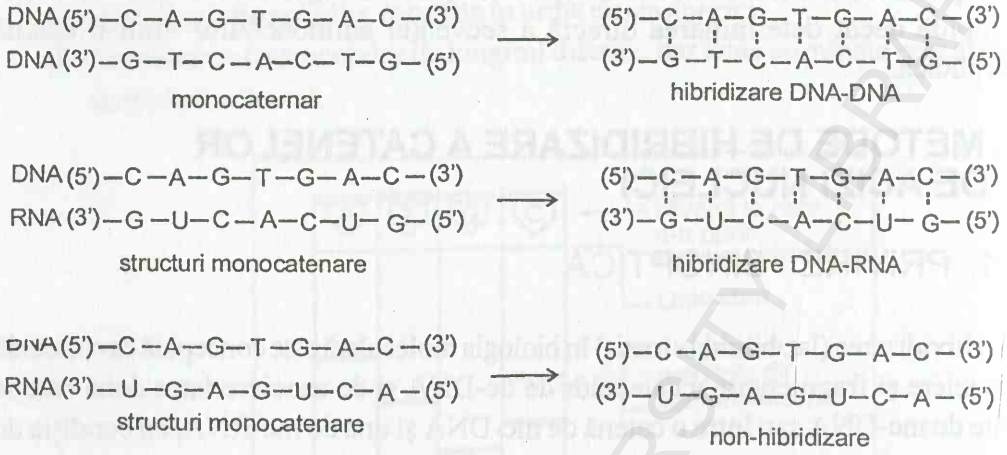


Fig. 6-5. Hibridizarea şi non-hibridizarea la acizii nucleici (explicaţii în text)

biosintezei cu încorporarea deoxiribonucleotidelor (prin replicaţie sau prin retrotranscripţie).

În procesul de hibridizare cu formare de dc-DNA pot exista situaţii în care mononucleotidele din cele două catene constituente au "*secvenţe palindromice*".

Noţiunea de palindrom (gr. palindromos - revenire pe vechiul drum) defineşte în genral un cuvânt sau un grup de cuvintre care se citesc la fel de la dreapta la stânga şi de la stânga la dreapta, având aceeaşi semnificaţie, e.g.: radar.

In cazul dc-DNA noţiunea de "palindrom" relevă complementaritatea unor secvenţe cu nucleobaze identice în cazul lecturării primei catene - de la stânga la dreapta cu secvenţele de nucleobaze lecturate pe a doua catenă - de la dreapta la stânga.

Se exemplifică cuvinte care au "specific" palindromic: în lb. română "elevele"; "ele fac cafele" (după Popa şi Repanovici, 1982); în lb. latină: "Roma tibi subito motibus ibit amor"; în lb. engleză: "Able was I ere I saw Elba" şi "Madam I'm Adam" (după Stryer, 1996)

Secvenţele palindromice sunt importante în tehnologia DNA recombinant. Spre exemplu s-a constatat că enzimele de restricţie de tip II (fenomenul de restricţie-modificaţie este caracterizat prin existenţa a trei grupe de enzime de restricţie, notate I-III), recunosc predilect secvenţe palindromice hexanucleotidice.

Se remarcă însă o mare varietate în tipurile secvenţelor de recunoaştere cât şi în tipurile de "extremităţi" produse în cursul hidrolizei. Aceste extremităţi care pot fi "netede" sau "coezive". Încă din 1977 Roberts a exemplificat enzimele de restricţie Eco R I şi Bam I (de fapt enzime din grupa endonucleazelor) care pot genera palindroamele hexanucleotidice:

în cazul Eco R I 5'-GAATTC-3'
3'-CTTAAG-5'

în cazul Bam H I 5'-GGATCC-3'
3'-CCTAGG-5'

Specificul secvenţelor de recunoaştere (numite curent "situsuri de recunoaştere) şi aspectul extremităţilor rezultate (netede sau coezive) reprezintă o problemă de interes major pentru aplicaţii în tehnologia DNA recombinant, asupra căreia se va reveni.

În scopul sesizării fragmentelor hibridizate se face marcarea izotopică a uneia dintre catene prin legarea nucleotidelor marcate cu ^{32}P sau ^{3}H în prezenţa timidindinkinazei (similar procedeului de secvenţializare).

Catenele marcate cu radionuclizi (radioelemente) sau cu compuşi organici sunt cunoscute sub numele de sonde moleculare: sonde DNA (DNA probes) şi sonde RNA (RNA probes) - v. Cap.6.4.

Procedural, hibridizarea se poate efectua *in vivo* - în organismul viu sau *in vitro* - în culturi de celule. Se menţionează chiar posibilitatea hibridizării *in situ* - intranuclear, cu perspective de extindere a aplicaţiilor.

În prezent se poate aplica metoda de "hibridizare in situ" controlabilă cu ajutorul tehnicilor de fluorescenţă. În jurul anilor '90 metoda era utilizată doar în laboratoarele de cercetare, îndeosebi în citogenetică. Aplicaţiile curente pot interesa diverse tipuri de ţesuturi, e.g.: probe prelevate prin biopsie sau autopsie la om; embrioni de şoarece, culturi celulare la plante, macromolecule de DNA şi RNA, cromosomi etc.

În analitica biochimică metoda de hibridizare este uzitată pentru perfectarea altor metode specifice biologiei moleculare, i.e.: metodele de detectare prin sonde moleculare; metodele de determinare ale fragmentelor de acizi nucleici (Southern blot analysis şi Northern blot analysis); metoda amplificării prin reacţia în lanţ a polimerazei (PCR).

Metoda hibridizării acizilor nucleici este utilizată, de asemenea, pentru studiul speciilor moleculare de DNA, a gradului de divergenţă dintre specii, genuri, familii (taxonomia biochimică), a localizării genelor (studiul genomului) ş.a.

6.3.3. DISOCIEREA SI ASOCIEREA ACIZILOR NUCLEICI

În biologia moleculară şi în biochimie studiile referitoare la hibridizare fac posibilă evaluarea diverselor aspecte fizico-chimice specifice reacţiilor de disoceire şi de asociere ale acizilor nucleici. Date şi diagrame privind aceste reacţii, compilate din literatura de specialitate (Darnell et al., 1986; Kaplan şi Delpech, 1990; Micklos şi Freyer, 1990; Boccara şi Verdiere-Sahuque, 1998 etc.), sunt prezentate în capitolele următoare.

Disocierea moleculelor dicatenare de DNA (dc-DNA) şi asocierea moleculelor monocatenare de acizi nucleici (mc-DNA şi mc-DNA, sau mc-DNA şi mc-RNA)

reprezintă probleme importante pentru biologia moleculară, genetică şi patologia biochimică. Din acest motiv s-au studiat diversele aspecte ale interacţiilor posibile, iar în literatura de specialitate apar diverşi termeni fără a exista convenţii de limitare sau circumscriere a utilizării acestora. Astfel, există termenii antitetici *asociere-disociere* împreună cu aceia de *denaturare-renaturare* în cazul monocatenelor DNA rezultate din molecula de dc-DNA.

Asocierea catenelor în sistemul mc-DNA / mc-DNA, cât şi în sistemul mc-DNA / mc-RNA este definită curent prin termenul de *hibridizare catenară.* Odată cu progresele realizate în biologia moleculară, această terminologie s-a impus tot mai mult. Termenii de disociere-asociere au fost utilizaţi iniţial pentru considerentul că nu induc confuzii (indiferent de tipul de monocatenă care participă la reacţie).

6.3.3.1. Reacţia de disociere a acizilor nucleici

Prin încălzirea DNA în soluţie se produc modificări ale vâscozităţii şi ale proprietăţilor optice interesând îndeosebi extincţia şi transmitanţa. Aceste modificări însoţesc separarea fizică a catenelor DNA, sau mai explicit *disocierea* moleculelor de dc-DNA cu formarea a două catene de mc-DNA. Separarea fizică a catenelor - cunoscută şi sub numele de *denaturare* - se produce la modificări ale temperaturii (în jur de 80-90°C) fiind dependentă de pH (pH=7) şi de forţa ionică a mediului (forţa ionică specifică pentru condiţiile fiziologice).

În cursul reacţiei de disociere a acidului deoxiribonucleic dicatenar se urmăresc: a) evaluarea efectului hipercromic; b) determinarea temperaturii medii de fuziune.

6.3.3.1.1. Efectul hipercromic

Evidenţierea aspectelor denaturării a fost studiată pe catene macromoleculare polinucleotidice cu specific de *homopolimeri,* e.g. acid polideoxiriboadenilic, poli dA format doar din deoxiriboadezinmonofosfat (dAMP) sau cu specific de *heteropolimeri* cu structură dicatenară (dc-DNA) sau monocatenară (mc-DNA), în compoziţia cărora se află deoxiribomononucleozidfosfaţi (deoxiribonucleotide) dMNP, în principal dAMP, dTMP, dGMP, dCMP precum şi pe amestec din deoxiribomononucleozidfosfaţii (amestec dMNP) menţionaţi mai sus.

Dacă o soluţie de dc-DNA este supusă încălzirii se constată o creştere a extincţiei. Această diferenţă de extincţie este numită *efect hipercromic.*

Studiul hipercromicităţii (hipercromiei) a evidenţiat modificarea extincţei la soluţii de dc-DNA, mc-DNA şi un amestec de dMNP de aceeaşi compoziţie (fig. 6-6). S-a observat astfel că extincţia (mărime adimensională) creşte în în funcţie de lungimea de undă (λ) în seria :

$$\text{dc-DNA} < \text{mc-DNA} < \text{amestec dMNP.}$$

Aceste diferenţe de extincţie caracterizează efectul de hipercromicitate în funcţie de lungimea de undă, exprimat de fapt prin relaţia: $E = f(\lambda)$.

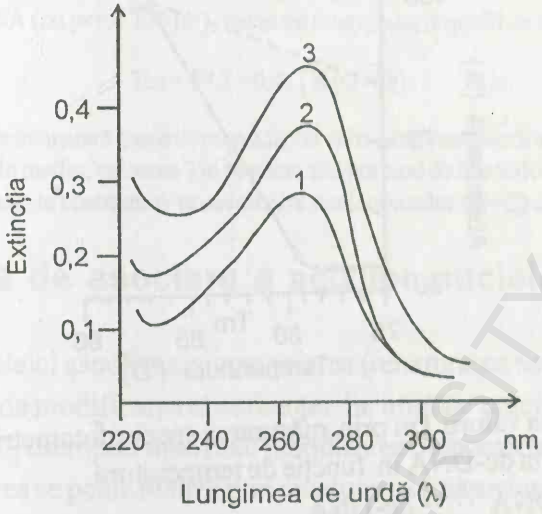


Fig. 6-6. Modificări ale hipercromicității - prezentare diagramatică
1) dc-DNA; 2) mc-DNA; 3) amestec dNMP

Efectul hipercromic nu este dat de ruperea legăturilor de hidrogen, fiind cauzat de slăbirea forțelor de înstivuire fapt care permite nucleobazelor să intre în contact cu solventul.

6.3.3.1.2. Temperatura de fuziune

În evaluarea proprităților fizico-chimice ale macromoleculei dc-DNA și în deosebi în estimarea denaturării acesteia se procedează și la determinarea *temperaturii medii de fuziune* (Tm).

Din punct de vedere fizico-chimic temperatura medie de fuziune sau temperatura de semidenaturare – notată abreviat Tm (engl. temperature of fusion; fr..temperature de demi-dénaturation), se definește ca temperatura la care 50% din moleculele de DNA dicatenar prezente în soluție, trec în stare de DNA monocatenar.

Valoarea Tm se determină spectrofotometric, la lungimea de undă (l) de 260 nm. Această valoare corespunde punctului de inflexiune al curbei caracterizată ca o relație între absorbanța A (%) și temperatura (°C). Formalismul matematic în acest caz se poate exprima ca o funcție (f'), prin relația generală:

$$A\ (\%) = f'\ (t^{\circ}C)$$

În diagrama prezentată în fig. 6-7 se redă modul de determinare grafică a valorii Tm prin măsurarea absorbanței A (%) pentru dc-DNA în funcție de temperatură t (^{0}C).

Experimental s-a constatat că valoarea Tm crește direct proporțional cu lungimea macromoleculei polihetero-nucleotidice de dc-DNA. Aceasta sugerează existența unui

B.C.U. "M. EMINESCU" IAȘI

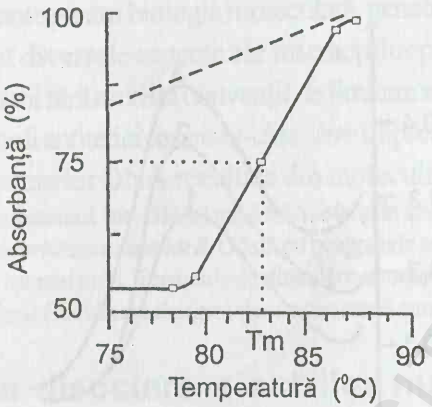


Fig. 6-7. Determinarea valorii Tm prin măsurarea spectrofotometrică a absorbanţei la dc-DNA în funcţie de temperatură
– – – mc-DNA ····· dc-DNA

efect corelativ între Tm şi lungimea dublului helix al DNA. Mai mult, s-a constatat că denaturarea termică a macromoleculei dc-DNA – caracterizată prin iniţierea deplasării catenelor constituente – este mai activă în regiunile bogate în perechi de nucleobaze A-T şi mai lentă în regiunile bogate în perechi de tipul G-C (compoziţia în nucleobaze se redă procentual). Deci, altfel exprimat iniţierea procesului de denaturare şi propagarea acestuia porneşte predilect de la perechile de nucleobaze A-T. Prezentarea schematică generală a acestei situaţii este redată în fig.6-8.

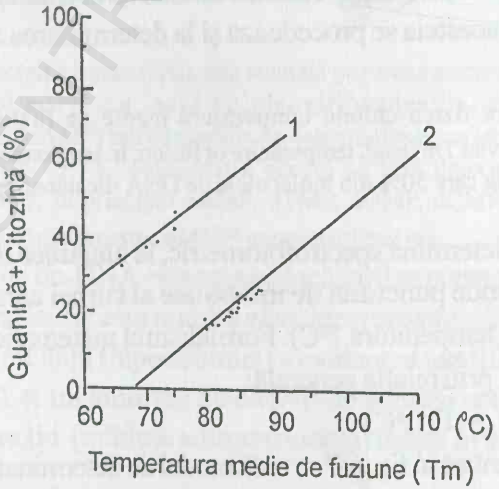


Fig. 6-8. Variaţia Tm în funcţie de compoziţia în G+C a dc-DNA în medii diferite:
1) în soluţie de 0,01 M H_3PO_4 şi 0,01M EDTA;
2) în soluţie de 0,15M NaCl şi 0,015M citrat de sodiu

BCU IASI/CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Experimental s-a demonstrat că în condiţii standard (un anumit mediu de reacţie) pentru macromolecula de dc-DNA (cu peste 200 pb), valoarea temperaturii medii de fuziune se poate afla prin relaţia:

$$Tm = 69,3 + 0,41\,[\%(G+C)]$$

Această relaţie, demonstrată empiric, relevă faptul că în cazul menţinerii unei concentraţii constante a cationilor monovalenţi din mediu, valoarea Tm se poate afla pornind de la coeficienţi numerici determinaţi experimental, dacă se cunoaşte cuantumul procentual al nucleobazelor (G+C) din DNA luat în studiu.

6.3.3.2. Reacţia de asociere a acizilor nucleici

La acizii nucleici asocierea şi reasocierea (renaturarea sau hibridizarea) poate fi estimată în funcţie de modificarea absorbanţei. Se impune precizarea că asocierea se poate produce "dirijat", exemplul tipic fiind hibridizarea monocatenelor de acizi nucleici, De asemenea, asocierea se poate realiza prin renaturarea (reasocierea) unor monocatene de acizi nucleici.

Reacţia de asociere este condiţionată de temperatură. Astfel, dacă temperatura soluţiei de mc-DNA scade, acesta rămâne sub formă monocatenară, fără a se modifica absorbanţa. Dacă se procedează la o încălzire treptată a soluţiei de mc-DNA, se formează molecula dublu helicală (dc-DNA) observându-se o diminuare a absorbanţei.

Reacţia de asociere în biologia moleculară şi în biotehnologie este numită în mod curent *hibridizare moleculară*. Această reacţie este condiţionată de prezenţa a trei perechi de nucleobaze şi a unui aport energetic (încălzirea soluţiei) ceea ce atestă faptul că este o reacţie endergonică.

Asocierea moleculelor se estimează prin diverşi parametrii, între care o importanţă aparte au: 1) viteza reacţiei de asociere; 2) cinetica reacţiei de asociere a catenelor (identice sau diferite).

6.3.3.2.1. Viteza reacţiei de asociere

Viteza reacţiei de asociere este condiţionată, în principal, de următorii factoridependenţi de caracteristicile moleculei de acid nucleic(e.g.: mc-DNA) şi de mediul de reacţie. Între aceşti factori se menţionează:

a) lungimea moleculei de mc-DNA: dacă molecula este de lungime mai mare, mediul acesteia este mai vâscos, fapt care conduce la depresia vitezei de renaturare. Deci se poate conchide că viteza scade odată cu creşterea vâscozităţii relevând existenţa unui raport de inversă proporţionalitate. Din aceste considerente în experienţele de rematurare sau de hibridizare dintre acizii nucleici sunt preferate fragmente care sunt

constituite din cca 400-500 deoxiribonucleotide (i.e. deoxiribonucleozidmonofosfaţi - dNMP).

b) originea catenelor de mc-DNA, e.g.: monocatenele pot să provină de la procariote sau de la eucariote. La monocatenele provenite de la eucariote – caracterizate în general prin lungime mai mare, viteza de renaturare este mai scăzută.

c) temperatura se află în relaţie de directă proporţionalitate cu viteza de renaturare: s-a constatat experimental că viteza creşte cu temperatura, estimându-se că există chiar o temperatură ideală a cărei mărime este cu cca 20-25°C mai redusă în comparaţie cu Tm al dc-DNA nativ.

d) valoarea forţei ionice – constatându-se că viteza de renaturare creşte odată cu creşterea forţei ionice. În condiţii experimentale exprimarea se face în raport cu concentraţia molară a cationilor din soluţia în care se află mc-DNA (e.g. concentraţia cationilor de K^+, Na^+).

În fig. 6-9 se prezintă variaţia vitezei de asociere (în unele cazuri de reasociere) a mc-DNA în funcţie de concentraţia ionilor de sodiu [Na^+] din mediul de reacţie.

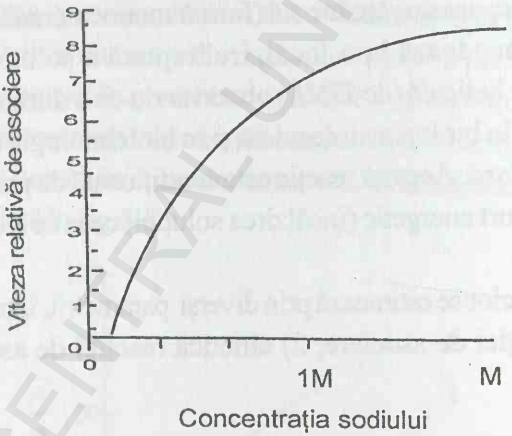


Fig. 6-9. Modificarea vitezei de asociere a mc-DNA în funcţie de concentraţia în ioni de [Na^+]

Pentru discutarea reacţiei de asociere a macromoleculelor mc-DNA vom considera existenţa a două monocatene mc-DNA (I) notată prin "a" şi mc-DNA (II) notată prin " b" care, conduc la formarea produsului de reacţie, adică a dc-DNA hibridizat, notat prin "p". Reacţia de renaturare (hibridizare) se poate reprezenta astfel:

$$a + b \underset{k_2}{\overset{k_1}{\rightleftharpoons}} p$$

în care k_1 – constanta de viteză a reacţiei de asociere (hibridizare)

k_2 - constanta de viteză a reacţiei de disociere (denaturare)

BCU CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Dacă există situația limită, caracterizată prin diferențe mari între constantele de viteză: $k_2 << k_1$, se poate considera că reacția este ireversibilă.

Pentru calculul vitezei de formare a produsului de hibridizare p, în timp, se vor considera concentrațiile corespunzătoare compușilor inițiali (reactanți) a – de concentrație C_a și b - de concentrație C_b și compusului final (produs de reacție) p de concentrație C_p.

Pornind de la aceste date se poate proceda la calculul vitezei de asociere bazată pe concentrația reactanților C_a și C_b și concentrația produsului de reacție C_p care depinde de concentrația relativă a acestora:

$$\frac{dC_p}{dt} = k.C_a.C_b \qquad (6\text{-}1)$$

se are în vedere faptul că la timpii:

t_0 există $C_a = C_{a(0)}$ și $C_b = C_{b(0)}$
t există $C_a = C_{a(0)} - C_p$ și $C_b = C_{b(0)} - C_p$

rezultând:

$$\frac{dC_p}{dt} = k\left(C_{a(0)} - C_p\right)\left(C_{b(0)} - C_p\right) \qquad (6\text{-}2)$$

de unde se obține:

$$\frac{dC_p}{\left(C_{a(0)} - C_p\right)\left(C_{b(0)} - C_p\right)} = kdt \qquad (6\text{-}3)$$

Apoi, prin integrare se poate obține:

$$\frac{1}{\left(C_{a(0)} - C_{b(0)}\right)} \ln \frac{C_{a(0)} - C_p}{C_{b(0)} - C_p} = kt + Q \qquad (6\text{-}4)$$

iar în situația în care t=0 și $C_p = 0$ rezultă:

$$Q = \frac{1}{C_{a(0)} - C_{b(0)}} \ln \frac{C_{a(0)}}{C_{b(0)}} \qquad (6\text{-}5)$$

Dacă se face diferența valorilor la timpul t și timpul 0, deci dintre termenii relației (6-4) și (6-5) se obține:

BCU IASI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

$$\frac{1}{C_{a(0)}+C_{b(0)}}\ln\frac{C_{a(0)}-C_p}{C_{b(0)}-C_p}-\frac{1}{C_{a(0)}-C_{b(0)}}\ln\frac{C_{a(0)}}{C_{b(0)}}=kt \qquad (6\text{-}6)$$

restrângând se ajunge la:

$$\frac{1}{C_{a(0)}-C_{b(0)}}\left(\ln\frac{C_{a(0)}-C_p}{C_{b(0)}-C_p}-\ln\frac{C_{a(0)}}{C_{b(0)}}\right)=kt \qquad (6\text{-}7)$$

din care se poate obține valoarea concentrației produsului de reacție (C_p) redată prin relația:

$$C_p=\frac{C_{a(0)}C_{b(0)}\left(1-e^{(C_{a(0)}-C_{b(0)}kt}\right)}{C_{a(0)}-C_{b(0)}e^{(C_{a(0)}-C_{b(0)})kt}} \qquad (6\text{-}8)$$

Astfel, sub raport teoretic şi experimental se vor studia distinct cinetica reacției de asociere prin renaturare şi respectiv cinetica reacției de asociere prin hibridizare. Reprezentarea diagramatică a asocierii diferă, de asemenea, fiind redată prin funcția f_1 în cazul asocierii prin renaturare:

$$\frac{C_a}{C_{a(0)}}=f_1\left(C_{a(0)}t\right) \qquad (6\text{-}9)$$

şi prin funcția f_2 în cazul asocierii prin *hibridizare:*

$$\frac{C_b}{C_{b(0)}}=f_2\left(C_{a(0)}t\right) \qquad (6\text{-}10)$$

Se remarcă faptul că în cazul asocierii catenelor, respectiv al asocierii catenelor mc-DNA şi mc-DNA sau a catenelor de mc-DNA şi mc-RNA există o abordare diferențiată care, are în vedere specificul structural al moleculelor.

6.3.3.2.2. Cinetica reacției de asociere

A. Asocierea catenelor mc-DNA / mc-DNA

Reacția de asociere a catenelor din sistemul mc-DNA / mc- DNA este o reacție de ordinul doi în raport cu concentrația a două monocatene homoloage. Această reacție în funcție de circumstanțe - poate fi numită şi reacție de reasociere sau hibridizare. Dacă vom considera cazul general în care "a" şi "b" sunt reactanți, iar "p" produsul de reacție se va

POLITEHNICA UNIVERSITY LIBRARY

putea scrie şi în cazul asocierii monocatenelor homoloage reacţia generală:

$$a + b \rightleftarrows p$$

În această reacţie de asociere, considerând că există compuşii iniţiali mc-DNA (I) şi mc-DNA (II) se poate scrie:

$$\underset{\substack{\text{catena (I)}\\ \text{precursori monocatenari}}}{\text{mc-DNA}} + \underset{\substack{\text{catena (II)}\\ \text{precursori monocatenari}}}{\text{mc-DNA}} \rightleftharpoons \underset{\substack{\text{produs de asociere}\\ \text{(hibridizare)}}}{\text{DNA - DNA}}$$

În ecuaţia iniţială obţinută pentru valoarea C_p (v.relaţia 6-8) există doi termeni de dezvoltare a interacţiilor, astfel că e^x ($e^x = 1 + x + x^2/2! + ... + x^n/n!$) conduce la relaţia (6-11):

$$C_p = \frac{C_{a(0)}C_{b(0)}\left[1 + C_{a(0)} - C_{b(0)}kt\right]}{C_{b(0)} - C_{a(0)}\left[1 + (C_{a(0)} - C_{b(0)}kt)\right]} = \frac{C_{a(0)}C_{b(0)}(C_{a(0)} - C_{b(0)})kt}{(C_{b(0)} - C_{a(0)}) - C_{a(0)}(C_{a(0)} - C_{b(0)})kt} \qquad (6\text{-}11)$$

Dacă $C_p = C_{a(0)} - C_a$ şi $C_{b(0)} = C_{a(0)}$

se poate scrie:

$$C_{b(0)} - C_a = \frac{C_{b(0)} - C_{a(0)}}{C_{b(0)}kt + 1} \qquad (6\text{-}12)$$

$$(C_{b(0)} - C_a)(C_{b(0)}kt + 1) = C_{b(0)}{}^2 kt \qquad (6\text{-}13)$$

în continuare:

$$C_{b(0)}{}^2 kt + C_{b(0)} - C_{b(0)}Cakt - C_a = C_{a(0)}{}^2 kt \quad | : kt \qquad (6\text{-}14)$$

de unde rezultă:

$$C_{b(0)}{}^2 + \frac{C_{b(0)}}{kt} - C_{b(0)}C_a + \frac{C_a}{kt} = C_{b(0)}{}^2 \qquad (6\text{-}15)$$

$$\frac{C_{b(0)}}{kt} + \frac{C_a}{kt} = C_{b(0)}C_a \qquad (6\text{-}16)$$

$$C_{b(0)} + C_a = \frac{kt}{C_{b(0)}.C_a} \qquad (6\text{-}17)$$

BCU IASI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Prin calcule succesive se ajunge la expresia:

$$\frac{C_a}{C_{a(0)}} = \frac{1}{kC_{a(0)}t + 1} \qquad (6\text{-}18)$$

Dacă se trasează diagrama cineticii reacţiei de asociere ca o funcţie f_1, redându-se astfel:

$$\frac{C_a}{C_{a(0)}} = f_1\left(C_{a(0)}t\right) \qquad (6\text{-}19)$$

se poate obţine grafic o curbă cu alura de inflexiune la $C_{a(0)}t_{1/2}$. Această diagramă permite studiul reacţiei de asociere (reasociere, hibridizare) în care de la doi precursori iniţiali monocatenari în sistemul mc-DNA / mc-DNA se ajunge la un produs de asociere. O prezentare a cineticii reacţiei de asociere se expune în fig. 6-10.

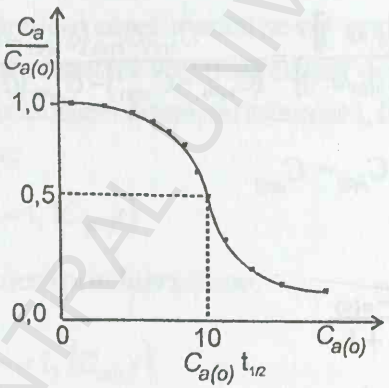


Fig. 6-10. Cinetica reacţiei de asociere în sistemul mc-DNA / mc-DNA

In general se poate afirma că viteza de asociere depinde de concentraţia iniţială a monocatenelor precursoare, deci a mc-DNA. În condiţiile experimentale se impune ca mc-DNA să se afle într-o concentraţie suficient de mare ca procesul de asociere să decurgă în condiţii normale, fără ca durata de timp să se extindă exagerat.

B. Asocierea catenelor mc-RNA / mc-DNA

Reacţia de asociere a monocatenelor mixte de acizi nucleici din sistemul mc-RNA / mc-DNA este utilizată în biologia moleculară şi aparţine metodei de hibridizare. Această metodă de operare specifică biologiei moleculare, are numeroase aplicaţii în biotehnologie.

BUAS CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

O astfel de situaţie se întâlneşte, spre exemplu, când se procedează la hibridizarea unui fragment catenar de mc-RNA cu o sondă moleculară de mc-DNA. Pentru explicitarea cineticii reacţiei vom considera mc-RNA ca fiind reactantul a şi mc-DNA ca reactantul b, aceştia constituind sistemul mc-DNA / mc-RNA. În urma reacţiei se va forma produsul de reacţie (p). Acest produs de reacţie este, de fapt, produsul de asociere (hibridizare) DNA-RNA. Reacţia generală este:

$$a + b \rightleftarrows p$$

sau mai concret:

mc-RNA + mc-DNA ——— > RNA - DNA

fragment catenar sondă moeculară produs de asociere

precursori monocatenari (hibridizare)

La începutul reacţiei, deci la timpul t = 0 este o cantitate excesivă de mc-RNA în raport cu mc-DNA. Astfel că ecuaţia care redă valoarea C_h la modul general:

$$C_p = \frac{C_{a(0)} C_{a(0)} \left(1 - e^{(C_{a(0)} - C_{a(0)})kt}\right)}{C_{b(0)} - C_{a(0)} e^{(C_{a(0)} - C_{b(0)})kt}} \qquad (6\text{-}20)$$

devine:

$$C_p = C_{a(0)} \left(1 - e^{-C_{a(0)} kt}\right) \qquad (6\text{-}21)$$

Se menţionează faptul că termenul de *"sondă moleculară"* defineşte o catenă scurtă (un fragment) de mc-DNA sau mc-RNA marcat radioactiv (sondă caldă) sau chimic (sondă rece). Astfel de sonde se utilizează pentru localizarea secvenţelor de mononucleotide dintr-un genom sau un amestec de RNA (v.Cap.6.4).

Având în vedere faptul că valoarea concentraţiei $C_{b(0)}$ iniţială nu se modifică deloc între timpul t=0 la debutul reacţiei şi timpul t de la finele reacţiei, definirea concentraţiei produsului de hibridizare h se poate face astfel:

$$C_p = C_{a(0)} - C_a \qquad (6\text{-}22)$$

$$C_{a(0)} - C_a = C_{a(0)} \left(1 - e^{-C_{b(0)} kt}\right) \qquad (6\text{-}23)$$

de unde

$$\frac{C_b}{C_{a(0)}} = e^{C_{b(0)} kt} \qquad (6\text{-}24)$$

BOJAI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Această reacţie, dat fiind spoecificul şi cuantumul precursorilor monocatenari, poate fi considerată ca o reacţie de ordinul I.

Şi în acest caz cinetica hibridizării se poate reprezenta prin trasarea diagramei funcţiei $C_b / C_{b(0)}$ reprezentând fracţiunea compusului monocatenar, i.e. mc-DNA în funcţie de produsul $C_{a(0)}t$. Prezentarea diagramatică se face în fig. 6-11.

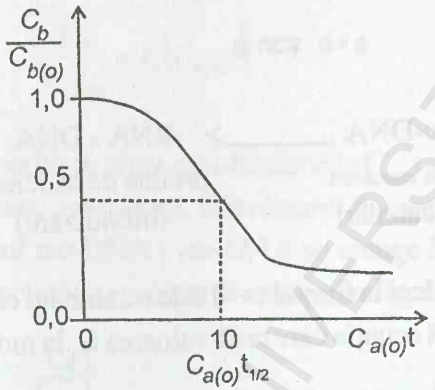


Fig. 6-11. Cinetica reacţiei de asociere în sistemul mc-RNA / mc-DNA

Se are în vedere existenţa unui timp de semireacţie în care $C_b = C_{b(0)} / 2$. În acest caz, pornind de la relaţia precedentă se poate scrie:

$$2 = e^{C_{a(0)}kt} \qquad (6\text{-}25)$$

$$\ln 2 = k \cdot C_{a(0)} \cdot t_{1/2} \qquad (6\text{-}26)$$

$$t_{1/2} = \frac{\ln 2}{kC_{a(0)}} \qquad (6\text{-}27)$$

În principiu, dat fiind specificul utilizării sondelor moleculare, se poate menţiona că timpul necesar - pentru semiasocierea (în speţă-semihibridizarea) unei sonde mc-DNA în prezenţa unui exces de mc-RNA - este independentă de concentraţia mc-DNA, depinzând doar de concentraţia iniţială a mc-RNA.

Modalitate de calcul. În experimentele privind studiul reacţiilor de denaturare - renaturare sau, exprimate la modul general, "reacţii de disociere-asociere", concentraţia DNA se calculează în mg / mL $^{-1}$, în condiţiile măsurării absorbanţei la lungimea de undă (λ)de 260 nm.

Pentru calculul numărului de perechi de baze dintr-o moleculă de DNA se porneşte de la considerentul că 1 pg DNA corespunde la 10^{-12} g. Apoi se calculează masa moleculară a DNA (M_{DNA}) în Daltoni (Da), astfel:

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

$$M_{DNA} = 10^{-12} N_A = 10^{-12} 6{,}02\ 10^{23} = 6{,}02\ 10^{11}\ Da$$

în care $N_A = 6{,}02\ 10^{23}$ - numărul lui Avogadro (numărul de molecule conținute într-un mol)

Având în vedere faptul că un mol de perechi de baze conține în medie 640 Da, se poate deduce numărul de perechi de baze (pb) din macromolecula de DNA.

Deci se raportează:

$$\frac{6{,}02 \cdot 10^{11}}{640} = 0{,}94 \cdot 10^{9}\ pb$$

de unde rezultă că 1 pg de DNA conține 940.000.000 perechi de baze.

6.3.4. METODE DE INVESTIGARE A REACȚIILOR DE DISOCIERE ȘI DE ASOCIERE

Studiul reacțiilor de disociere și de asociere a monocatenelor de DNA, sau în exprimarea clasică a reacțiilor de denarturare și renaturare, se face - în general - în mediu lichid.

Metodele de investigare se bazează pe diferențele dintre proprietățile fizice de mc-DNA și dc-DNA. Denaturarea dc-DNA se poate face termic - prin încălzire sau prin modificare de pH a mediului - la pH alcalin.

În general, DNA nativ se diferențiază de DNA denaturat prin mai multe metode: a) metoda spectroscopică în ultraviolet; b) metoda cromatografică pe suport de hidroxiapatită; c) metoda enzimatică cu endonuclează.

a) Metoda spectroscopică în ultraviolet

Această metodă se bazează pe determinarea variației de absorbție în funcție de variația de temperatură, la lungimea de undă de 260 nm.

Absorbția la această lungime de undă în cazul dc-DNA este mai redusă comparativ cu mc-DNA. În condițiile în care concentrația de acid nucleic nu variază în cursul reacției de hibridizare, scăderea temperaturii corespunde creșterii cantității compusului hibridiazat.

Această metodă este practicată în spectrofotometrie în condițiile în care cuva este supusă termostatării.

Metoda nu se pretează utilizării pentru studiul cineticii de asociere (reasociere) în cazul în care DNA are secvențe repetitive.

BCU "AUREL VLAICU" UNIVERSITY LIBRARY

b) Metoda cromatografică pe suport de hidroxiapatită

Folosirea hidroxiapatitei ca suport în cromatografia DNA prezintă avantajul că reţine dc-DNA, dar nu poate fixa mc-DNA - în situaţia în care se menţin constante temperatura şi forţa ionică.

Dacă se creşte forţa ionică, dc-DNA poate fi eluat. Cantităţile de mc-DNA nu sunt fixate. În aceste condiţii dc-DNA hibrid, eluat, poate fi determinat prin spectrofotometrie.

În situaţia în care s-a utilizat un DNA marcat radioactiv se poate măsura radioactivitatea compusului rezultat.

În general se procedează, de asemenea, la determinarea procentajului care redă statusul hibridizării catenelor.

Metoda cromatografică pe suport de hidroxiapatită (un compus care conţine fosfat de calciu) are avantajul de a fi, ino tempore, o metode analitică şi / sau preparativă. Ca metodă preparativă, cromatografia pe hidroxiapatită permite separarea unor molecule de dc-DNA care s-a reasociat rapid, în raport cu alte molecule de dc-DNA care se reasociază lent.

c) Metoda enzimatică cu endonucleză

Se bazează pe utilizarea unei endonucleaze specifice endonucleaza S_1 - care degradează doar mc-DNA. Procesul degradării - care in facto este produs de hidroliză - are " specifitate de monocatenă". Dacă sonda DNA este marcată de un izotop radioactiv (e.g. ^{32}P-mc-DNA) este posibilă măsurarea cantitativă a dc-DNA (asociat) - nonhidrolizabil şi a mc-DNA (neasociat) - hidrolizabil. În această manieră metoda enzimatică bazată pe acţiunea endonucleazei permite investigarea statusului reacţiei de asociere-disociere.

6.4. METODE DE DETECTARE PRIN SONDE MOLECULARE

6.4.1. PRIVIRE SINOPTICA

Sondele moleculare sunt fragmente de DNA sau RNA care permit recunoaşterea prin complementaritate - pe baza metodei de hibridizare - a diverselor secvenţe dintr-o moleculă de acid nucleic.

Astfel, spre exemplu, după obţinerea fragmentelor de DNA genomic (aşa numita

"bibliotecă de DNA "), în biologia moleculară se impune identificarea clonelor care conţin genele ce urmează a fi izolate sau a unor fragmente din aceste gene.

In scopul identificării fragmentelor moleculare de DNA se folosesc aşa numitele "sonde moleculare" genice (în opinia noastră denumirea de "sonde genetice" utilizată în biologia celulară nu reflectă cu acurateţe modul de operare cu astfel de "sonde" în biologia moleculară). Aceste sonde permit recunoaşterea şi fixarea fragmentelor de DNA. Sondele moleculare genice sunt folosite, în prezent, tot mai frecvent datorită specificităţii de fragment şi a reactivităţii (la care se adaugă economicitatea - preţul scăzut).

Datorită acestor avantaje sondele DNA au fost utilizate la detectarea unor maladii ereditare, mergând chiar până la stadiul fetal (deci prenatal), în diagnosticul unor infecţii virale etc.

Obţinerea sondelor moleculare utilizabile pentru detectarea acizilor nucleici implică succesiunea unor etape (Darnell et al., 1986; Kaplan şi Delpech, 1990; Stanciu şi Dumitru, 2001). O prezentare a principalelor etape se face în continuare:

- obţinerea sondei moleculare (i.e. DNA sondă sau RNA sondă) prin sinteză organică sau prin hidroliză biochimică efectuate cu enzime de restricţie. Obţinerea sondelor moleculare cu ajutorul enzimelor de restricţie (endonucleaze de restricţie) reprezintă un procedeu aplicat îndeosebi pentru obţinerea unor fragmente de gene virale;
- marcarea sondei moleculare prin procedee radiochimice (sondele calde) sau chimice (sondele reci);
- obţinerea DNA genomic ("biblioteca de DNA") din celule procariotice sau din celule eucariotice - în funcţie de scopul investigaţiei;
- activarea concomitentă a sondei moleculare şi a DNA genomic care face obiectul investigaţiei;
- desfăşurarea reacţiei de hibridizare, care are specificul unei reacţii de asociere a catenelor de acizi nucleici, i.e. DNA sondă - DNA genomic;
- elongarea DNA sondă prin inserarea deoxiribonucleozidmonofosfaţilor (dNMP). Această etapă se realizează sub acţiunea enzimei DNA ligaza (care este o DNA polimerază) şi are ca reper DNA genomic cu funcţia de matrice;
- evidenţierea rezultatelor hibridizării şi elongării bazate pe complementaritatea nucleobazelor (A=T; G=C). Specificul acestei etape rezidă în diferenţieri dependente de modul de marcare a sondei (sonde calde, sonde reci);
- înregistrarea datelor obţinute prin vizualizare în urma electroforezei în gel de agaroză tratat cu bromură de etidium (v. Cap. 6.5.)

BCU IAŞI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Marcarea sondelor moleculare a stat la baza clasificării acestora. În funcţie de modul de marcare se disting două tipuri de sonde moleculare: *sonde radiomarcate (calde)* şi *sonde chimiomarcate (reci)*. Unele detalii asupra acestora se prezintă în continuare.

Sondele moleculare, graţie specificităţii de fragmentat şi a reactivităţii, şi-au aflat utilizare şi în investigarea moleculelor de DNA şi RNA. Sondele moleculare se utilizează în determinarea fragmentelor de acizi nucleici (v. Cap. 6.5.) aplicate curent în laboratoarele de profil pentru determinarea secvenţelor specifice dintr-un fragment de DNA (metoda Southern) şi a fragmentelor din molecule de mRNA (metoda Northern). De asemenea, sondele moleculare se pot utiliza în aplicaţiile metodei de amplificare prin reacţia în lanţ a polimerazei - PCR (Polymerase Chain Reaction) - v. Cap. 6.6.

6.4.2. SONDE MOLECULARE RADIOMARCATE

Sondele moleculare radiomarcate sunt denumite şi sonde "calde". Markerul În cazul acestor sonde este un radionuclid, e.g.: ^{32}P sau ^{35}S . Radioizotopii sunt încorporaţi în molecula de acid nucleic in vivo - prin introducerea în mediul de cultură (e.g.: ^{32}P sau ^{3}H) sau biochimice cu ajutorul enzimelor (e.g.: ^{32}P sau ^{35}S) Aceste sonde sunt remarcabile prin specificitatea de fragment molecular şi prin reactivitate.

Avantajul esenţial al sondelor moleculare calde rezidă în sensibilitatea ridicată, fapt care permite identificarea DNA genomic, recte a genelor sau fragmentelor de gene. Din aceste motive, şi pentru astfel de situaţii se foloseşte noţiunea de sonde moleculare genice radiomarcate. Un alt avantaj al acestor sonde rezidă în faptul că permit detectarea (vizualizarea) prin autoradiografie (pe filme sau plăci fotografice).

Detectarea sondelor radiomarcate este posibilă datorită faptului că radionuclizii utilizaţi emit particule β negative (electroni). Astfel se ştie că ^{32}P emite particule β de energie ridicată, deci cu impact crescut asupra emulsiei fotosensibile (de pe filmul utilizat la radiografie, dar cu rezoluţie mai scăzută). In cazul ^{35}S, ^{3}H, ^{125}I, particulele β emise au o energie mai scăzută, deci determină o sensibilizare mai redusă a filmului utilizat pentru autoradiografie (necesitând timp ami lung pentru expunere), însă au o rezoluţie mai bună.

Experimental, într-o primă etapă, se face transferul unei părţi din clonele obţinute în prealabil pe filtrul de hârtie cu nitroceluloză. Pe acest filtru bacteria este distrusă şi DNA este denaturat (mediul cu salinitate crescută, îndeosebi în ioni de Ca^{2+}).

În continuare DNA rezultat este hibridizat de cDNA radiomarcat (sonda moleculară caldă), şi se face detectarea prin autoradiografie a clonelor radioactive.În final se face prelevarea clonelor corespunzătoare şi sunt supuse multiplicării rapide pentru a avea o cantitate importantă din DNA al genei care urmează a fi studiată.

Utilizarea radioizotopilor, în general, prezintă unele dezavantaje în primul rând dependente de dotările necesare pentru un laborator de profil şi în al doilea rând condiţionate de timpul de înjumătăţire al izotopilor (v. Balaban et al., 1979; Kruh, 1987; Radu, 2001)

6.4.3. SONDE MOLECULARE CHIMIOMARCATE

Sondele moleculare chimiomarcate denumite şi sonde "reci" sunt caracterizate prin faptul că se utilizează un marker chimic. Din acest considerent sunt denumite sonde moleculare "reci". Acreditarea termenului de "*sonde moleculare chimiomarcate*". face posibilă distincţia de compoziţie şi structură În raport cu "sondele moleculare radiomarcate", descrise mai sus.

Marcarea chimică, cu o substanţă neutră, se poate face utilizând diverşi compuşi care se pretează caracterului de "sondă moleculară". În funcţie de natura markerului se disting modurile de marcare *direct* şi *indirect*. In continuare se prezintă câteva caracteristici ale diverselor sonde moleculare chimiomarcate.

6.4.3.1. Sondele moleculare chimiomarcate direct

Se obţin cu ajutorul unor markeri specifici: substanţe cu acţiune enzimatică (e.g. peroxidaza, fosfataza alcalină), sau substanţe fluorescente (e.g. fluoresceina, rodamina).

În cazul markerilor *enzimatici* (e.g. peroxidaza, fosfataza alcalină) vizualizarea este posibilă ca urmare a interacţiei enzimă-substrat. Substratul degradat poate conduce la formarea unei substanţe de culoare diferită În raport cu substratul (iniţial). Asfel devine posibilă reperarea hibridizării.

Utilizarea markerikor *de fluorescenţă* (e.g. fluoresceina, rodamina) face posibilă vizualizarea pe filtru (folia) de nitroceluloză, sub acţiunea radiaţiilor ultraviolete (UV). La astfel de sonde radiaţiilor UV rar determină colorarea specifică, e.g.: fluoresceina va prezenta o culoare verde, iar rodamina o culoare roşie. Substanţele fluorescente utilizate ca markeri pot fi denumite şi "markeri de fluorocromare".

6.4.3.2. Sondele moleculare chimiomarcate indirect

Marcarea indirectă poate fi realizată cu ajutorul unor vitamine, e.g.: biotinei (vitamina H). Aceşti markeri, având o moleculă mai mică (comparativ cu enzimele), pot

permite realizarea mai facilă a hibridizării moleculare.

Pentru sondele moleculare marcate biotinic se are în vedere interacţia acesteia cu avidina (prezentă în albuşul de ou) prealabil activată enzimatic. Detectarea sondelor moleculare se face cu anticorpi anti-biotină sau cu avidină. In general se urmăreşte utilizarea unor glicoproteine cu afinitate puternică pentru biotină. Aceşti compuşi sunt conjugaţi cu fluorocromi care facilitează detectarea. Detaliile metodologice referitoare la acest tip de sonde nu fac obiectul prezentei treceri în revistă a tipurilor de sonde moleculare.

În general se poate confirma că sondele moleculare radiomarcate sunt mult mai active decât sondele moleculare chimiomarcate, ceea ce face ca acestea să fie preferabile pentru acurateţea şi expeditivitatea lucrărilor. În ansamblu, se poate afirma că sondele moleculare prezintă reactivitate uşoară, specificitate şi economicitate.

Sondele moleculare se pretează utilizării în scop de diagnostic. Astfel de situaţii sunt caracterizate prin parcurgerea unor etape, metodologic distincte, specifice scopului urmărit (Kruh, 1987; Cajal, 1990)

Sub raport aplicativ, sondele moleculare sunt utilizate pentru detectarea prezenţei genelor virale, e.g.: pentru virusul hepatitei B în probele de sânge. Se preconizează utilizarea de sonde moleculare şi în cazul unor teste pentru virusul HIV, de asemenea, pentru investigaţii asupra oncovirusurilor etc.

6.5. METODE DE INVESTIGARE A FRAGMENTELOR MOLECULARE DE ACIZI NUCLEICI

6.5.1. PRIVIRE SINOPTICA

Metodele de investigare a fragmentelor de acizi nucleici sunt utilizate în cazul identificării genelor codante pentru proteine, existente în cadrul genomului (metoda Southern de analiză a DNA) şi în cazul decelării şi cuantificării acidului ribonucleic mesager din diverse ţesuturi (metoda Nothern de analiză a mRNA).

Utilizarea acestor metode implică cunoşterea specificului şi a similitudinilor analitice. Specificul acestor metode rezidă În diferenţele de compoziţie şi structură a substanţelor studiate. Similitudinile analitice relevă existenţa unor etape de investigare bazate pe aceleaşi tehnici.

6.5.2. METODA SOUTHERN

Metoda de analiză Southern denumită adesea "Southern blot analysis" (engl. blot - pată, grund), este un procedeu utilizat în decelarea secvenţelor specifice conţinute într-un anumit fragment de DNA din genom.

În laborator această metodă, introdusă de Edwin Southern în anul 1975, se utilizează în reperarea genelor codante pentru o proteină dată. Metoda se află şi la baza unor tehnici de diagnostic.

Procedural se realizează izolarea DNA genomic şi incizarea catenară specifică numită şi clivare sau secţionare moleculară cu o enzimă de restricţie.

Se procedează apoi la separarea - după mărime - prin electroforeza pe gel-agaroză. Electroforeza este urmată de vizualizarea fragmentelor de DNA prin tratare cu bromură de etidium (EtBr) urmată de formarea unui complex colorat care prezintă fluorescenţă în lumina ultravioletă - culoare roşietic-portocalie.

În cazul DNA de la om, după incizia catenară specifică (clivare moleculară) cu o enzimă de restricţie, se procedează la separarea prin electroforeză pe gel de agaroză şi tratare cu EtBr. Fragmentele de DNA de la om se pot vizualiza sub forma unor "pete" caracteristice.

Apariţia sub formă de "pete" este explicată de mărimea genomului uman cca $3,3 \cdot 10^9$ perechi de baze. La o enzimă de restricţie (cu intervale de la 6 perechi de baze) locul de recunoaştere - din punct de vedere statistic - este la a 4096-a pereche de baze. Asfel, prin incizia catenară cu o enzimă de restricţie (cu interval de 6 perechi) pot să apară aproximativ 800 000 ($3,3 \cdot 10^9 / 4096$) fragmente de DNA (Sittman, 1994). Acest număr impresionant de fragmente nu pot fi separate distinct prin electroforeză. Din acest motiv în electroforeza pe gel de agaroză catenele apar sub forma unor "pete" (denumite În literatura de specialitate de limbă engleză "smear") specifice, vizualizate la colorarea cu EtBr.

După colorare se procedează la tratarea gelului de agaroză - deci implicit a DNA denaturat existent pe acesta - cu o soluţie tampon alcalin (NaCl/NaOH).

Într-o etapă ulterioară, DNA denaturat este transferat de pe gel-agaroză pe un filtru de hârtie cu nitroceluloză printr-o tehnică specială cunoscută sub denumirea general acreditată de "Southern blotting". În acest fel DNA se va fixa pe hârtia de filtru cu nitroceluloză într-o poziţie relativ asemănătoare a migrării în electroforeză (Kruh, 1987; Gârban, 1972).

Se procedează apoi la hibridizarea DNA de pe filtrul de nitroceluloză folosindu-se o sondă radiomarcată care poate conţine:

a) RNA mesager (mRNA), corespunzător proteinei studiate sau

b) DNA complementar (cDNA), sintetizat cu ajutorul reverstranscriptazei.

Filtrul de nitroceluloză este spălat pentru eliminarea "sondei" care nu au fost hibridizată. Se face apoi o autoradiografie, detectându-se doar fragmentele de DNA care conţin genele corespunzătoare sondei.

O reprezentare a etapelor analitice caracteristice pentru "fragmentele inelate" (annealed fragments) - înţelegând prin aceasta fragmentele stabilizate prin legarea vector-pasager (i.e. DNA circular) - se redă în fig.6-13.

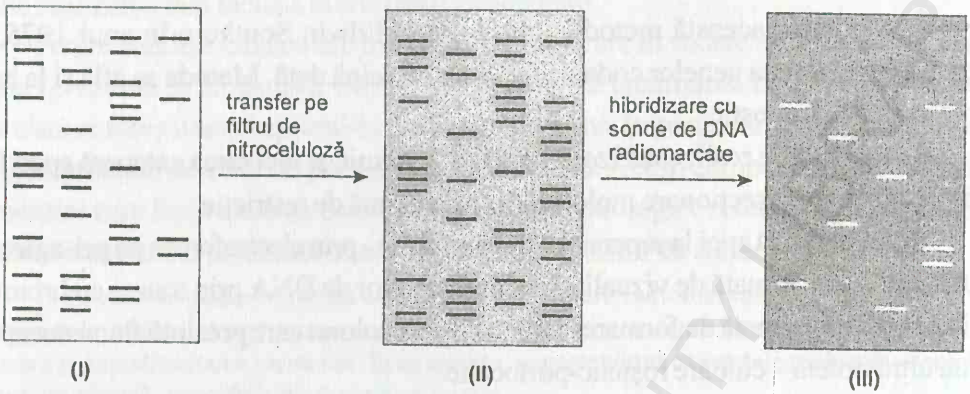


Fig.6-13. Etape analitice în metoda Southern - reprezentare schematică
(I) Gelul cu fragmente de DNA după separare prin electroforeză;
(II) Filtrul de nitroceluloză cu fragmente de DNA;
(III) Autoradiografia cu identificarea fragmentelor de DNA ciclizate

Prin metoda Southern se poate identifica numărul de gene dintr-un genom. Se menţionează însă că genele se pot hibridiza, dar nu în totalitate. Hibridizarea nu este niciodată perfectă. Pentru aceasta se are în vedere prezenţa intronilor şi exonilor şi caracteristicile structurale şi funcţionale ale acestora (Maniatis et al, 1982; Kruh, 1987).

De asemenea, se remarcă faptul că metoda Southern se pretează utilizării în etapele preliminare pentru evaluarea polimorfismului lungimii fragmentului de restricţie al DNA, procedeu cunoscut prin abrevierea îndeobşte utilizată RFLP (Restriction Fragment Length Polimorphism) şi pentru studiul amprentelor genetice ale DNA (denumite în limba engleză "DNA fingerprint", iar limba franceză "ampreinte genetique"). Prin extinderea aplicaţiilor metoda Southern a făcut posibilă studierea genomului (Sittman, 1994).

6.5.3. METODA NORTHERN

Această metodă prezintă unele similitudini cu precedenta, diferenţa esenţială rezidă în faptul că metoda de analiză Nothern (Nothern blot analysis) se pretează pentru decelarea secvenţelor din molecula de RNA mesager (mRNA). În cazul acestei metode se utilizează un procedeu de hibridizare specific (Alwine et al, 1977).

Sub aspect analitic, această metodă este considerată a fi complementară metodei Southern. Pentru acest motiv s-a acreditat în "argoul specialiştilor din domeniul biologiei

moleculare, denumirea de "metoda de analiză Nothern" sau "metoda Northern". Această denumire a fost preluată şi în literatura de specialitate.

Modul de lucru rezidă în izolarea RNA şi separarea prin electroforeză într-un *gel de agaroză denaturată*. Utilizarea denaturantului asigură separarea - după mărime - a fragmentelor de mRNA. În absenţa denaturantului de gel agaroză, mRNA formează o structură secundară care face imposibilă separarea electroforetică după mărime.

Similar metodei precedente, mRNA separat electroforetic este transferat din gel pe un filtru de hârtie cu nitroceluloză (NC). Apoi, în continuare se face hibridizarea mRNA de pe filtrul cu NC cu o "sondă" corespunzătoare. În final se face autoradiografia folosind proectarea razelor X pe proba în lucru, sub care este o bandă de film. Asfel, se detectează hibridul format.

Prin metoda Notherm se procedează, în primul rând, la decelarea şi cuantificarea mRNA specific diferitelor ţesuturi (Sittman, 1994). Cuantificarea rezidă în determinarea concentraţiei relative a acestor macromolecule în funcţie de intensitatea benzilor autoradiografice (Kruh, 1987).

6.6. METODA AMPLIFICARII PRIN REACTIA IN LANT A POLIMERAZEI (PCR)

6.6.1. PRIVIRE SINOPTICA

Metoda amplificării prin reacţia în lanţ a polimerazei este o metodă analitică de investigare a acizilor nucleici, care rezidă în amplificarea moleculei de DNA prin utilizarea a două molecule scurte de DNA numite "primeri".

Amplificarea, ca proces chimic, se realizează în cadrul unor runde (cicluri) repetitive de sinteză a DNA in vitro (Erlich, 1989, Mead et al., 1991; Sittman, 1994).

Metoda este cunoscută în limba franceză sub numele de *"méthode d'amplification électivé in vitro de séquences d'acides nucléiques"*, i.e. metoda amplificării selective in vitro a secvenţelor de acizi nucleici, iar în limba engleză sub numele de *"Polymerase Chain Reaction"*, i.e. reacţia în lanţ a polimerazei - abreviată prin acronimul PCR. Această abreviere este acreditată în literatura de specialitate de circulaţie internaţională, implicit în literatura de limba franceză (Kaplan şi Delpech, 1990).

Această nouă metodă, iniţiată în perioada 1980-1982, a fost percepută ca o revoluţie metodologică în biologia moleculară. Metoda se remarcă prin faptul că face posibilă obţinerea unui număr impresionant de copii ale unor secvenţe specifice din DNA genomic, secvenţe care pot reprezenta gene.

6.6.2. PRINICIPII METODOLOGICE

In caz că secvenţa unui fragment de DNA este cunoscută, aceasta poate fi amplificată specific in vitro printr-un procedeu de extensie folosind secvenţe scurte de deoxiribonucleotid- monofosfaţi (dNMP), constituind molecule scurte de DNA denumite uzual "amorse" (fr. amorces) sau "primeri" (engl.primers).

Obişnuit se utilizează "primeri" reprezentaţi de oligodeoxiribonucleotide de sinteză constituite din 20-25 deoxiribonucleotide. Primerii (amorsele) se dispun de o parte şi de alta la extremităţile 3` ale catenelor de DNA dc care urmează a fi amplificate (fig. 6-14).

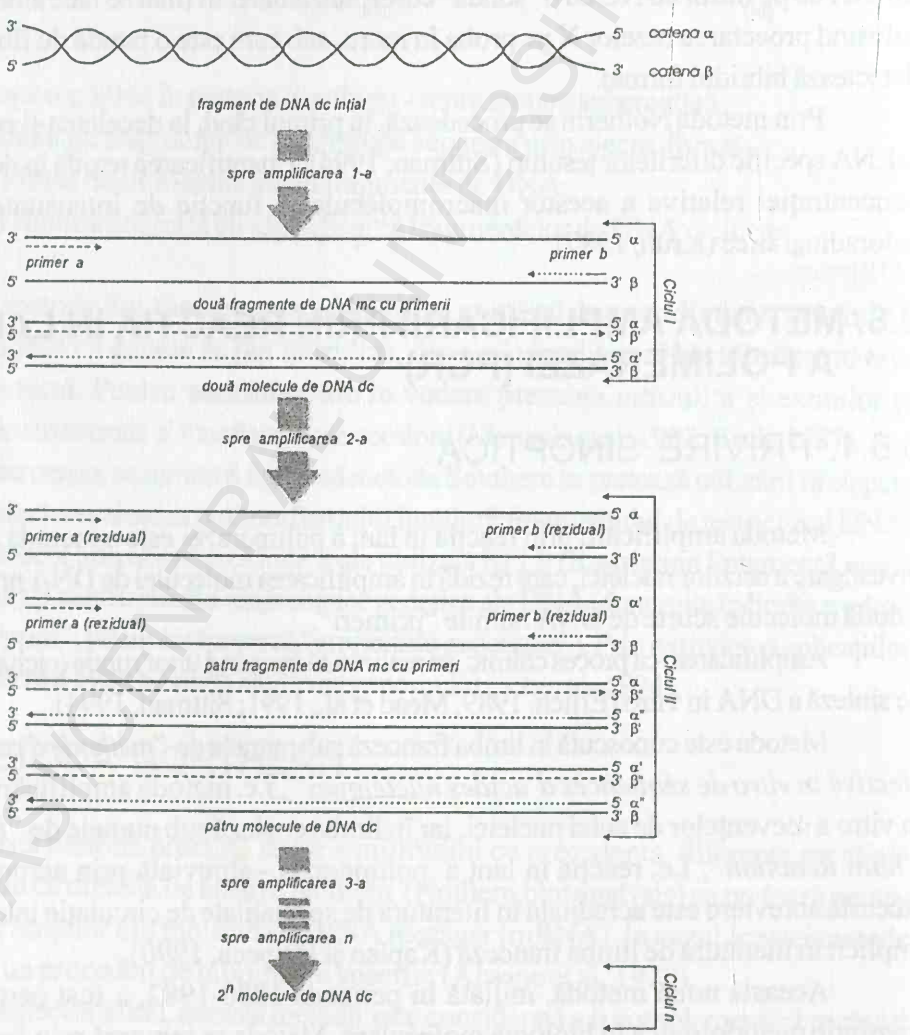


Fig. 6-14. Amplificarea selectivă in vitro prin PCR a unui fragment de DNA sub acţiunea primerilor (Gârban, 1994)

In prealabil se realizează condiţiile unei denaturări termice a fragmentului de DNA genomic (iniţial) cu eliberarea catenelor A şi B, deci cu formarea moleculelor de DNA mc. Apoi se face mixajul dintre fragmentele de DNA mc cu doi primeri "a" şi "b" specifici pentru extremităţile 3` ale catenelor A şi B. In cazul asigurării condiţiilor de interacţie (reactanţi, enzimă, temperatură) are loc poziţionarea primerilor în funcţie de criteriul "complementarităţii nucleobazelor" urmată de hibridizare.

Primerii, dispuşi opozabil, determină amplificarea fiecărei catene de DNA mc prin reacţia în lanţ a polimerazei. Astfel, din fiecare fragment de DNA mc - ca rezultat al acţiunii DNA polimerazei - se formează o moleculă de DNA dc. Reiese că, în final, din două fragmente de DNA mc se formează două molecule de DNA dc. In acest fel se încheie un "ciclu de amplificare" prin metoda reacţiei în lanţ a polimerazei. Operaţiunile se reiau fiind urmate de un nou ciclu.

Remarcabil este faptul că metoda amplificării prin PCR se pretează producerii unui numar impresionant de secvenţe de DNA genomic fără a se face uz de clonarea prin mijloace devenite clasice. Amplificarea (numită în unele tratate şi "extensia") asigură elongarea fragmentului de DNA. Din acest motiv poate fi considerată o reacţie cu caracter ciclic.

6.6.2.1. Particularitătile ciclului de amplificare

Noţiunea de "ciclu de amplificare" este improprie pentru considerentul că există două aspecte distincte: raportarea la timp - caracterul ciclic al modului de operare şi raportarea la spaţiu - caracterul cvasiexponenţial (cauzat de faptul că randamentul nu este 100%) al creşterii cantităţii produsului de amplificare.

Dincolo de aceste aspecte de detaliu, în accepţia terminologiei de uz curent există noţiunile de "ciclu de amplificare" sau "rundă de amplificare" sau "ciclu repetitiv". Ciclurile repetitive (fig. 6-15) prezintă trei etape distincte, marcate de modificarea modului operator:

1) Denaturarea termică - vizează fragmentul de DNA dc genomic luat în studiu şi formarea, la temperatura de 95°C în timp de 2-3 minute, a două catene de DNA mc.
2) Dispunerea primerilor şi hibridizarea acestora la catenele de DNA mc - se realizează la temperatură de cca 37°C şi durează 30 sec - 2 min. Primerii sunt oligodeoxiribonucleotide care au o secvenţă complementară catenelor de DNA mc formate în urma denaturării termice. Această structură face posibilă hibridizarea catenelor de DNA mc rezultate în denaturare cu primerii constituiţi din oligonucleotide. Pentru sinteza de primeri se foloseşte ca matriţă catena de DNA.

3) Amplificarea (extensia) catenei de DNA - se face prin sinteză şi decurge după mecanismul specific replicaţiei, utilizând o DNA polimerază termorezistentă.

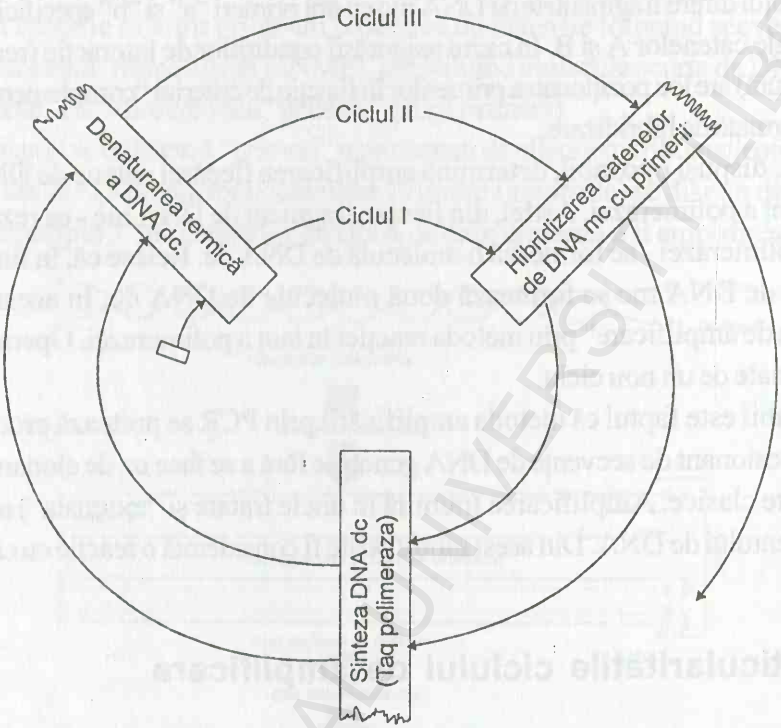


Fig. 6-15. Cicluri repetitive specifice metodei de amplificare prin PCR (Gârban, 1994)

Această etapă se desfăşoară la temperatură de 70°C şi durează 2-4 minute.

Amplificarea se produce exponenţial: astfel teoretic în cazul a n cicluri se produc 2n fragmente de DNA. In practica de laborator randamentul este de 70% (Kaplan şi Delpech, 1990).

Pentru realizarea amplificării prin PCR se utilizează o DNA polimerază termorezistentă, aceasta fiind Taq polimeraza. Această enzimă a fost izolată de la bacteria Thermus aquaticus, care trăieşte în mediu acvatic la temperaturi de cca 75°C. Enzima se adaugă doar la începutul operaţiunilor rămânând activă pe toată durata ciclurilor repetitive (de amplificare), rezistând la temperaturi de până la 95°C.

In laboratoarele de biologie moleculară Taq polimeraza se utilizează curent începând cu anul 1988. In perioada anterioară se utiliza Eco polimeraza (obţinută de la bacteria E. coli), dar fiind termolabilă se degrada la fiecare ciclu, necesitând introducerea la fiecare nouă operaţiune.

Metoda PCR se realizează relativ simplu şi se pretează automatizării, necesitând variaţii termice de o manieră programabilă. Astfel, încălzirea şi răcirea "sistemului" pentru runde (cicluri) repetitive ale sintezei poate fi asistată şi controlată de un computer.

Amplificarea produsă este riguros specifică dacă primerii (amorsele) corespund secvenţelor din DNA genomic iniţial. O amplificare eronată nu se poate derula cu eficienţă deoarece lungimea fiecărui primer este de 20-25 mononucleotide, ceea ce conduce la evitarea hibridizării non-specifice. In cazul apariţiei unei amplificări non-specifice aceasta poate fi consecinţa unei duble hibridizări care afectează o altă parte a fragmentului de DNA genomic decât aceea de la extremitatea 3' a catenei. Această coincidenţă este însă improbabilă.

Prin metoda PCR s-a realizat o revoluţionare a metodologiei în biologia moleculară pentru considerentul că a devenit posibilă - pentru prima dată- obţinerea fără clonaj, a unei amplificări considerabile şi de o acurateţe deosebită.

Incercându-se o comparaţie se poate arăta că metoda Southern - considerată deja clasică - necesită în medie 1 g de DNA genomic echivalând cu conţinutul de DNA din 150.000 de celule (considerând randamentul de extracţie de 100%). Spre deosebire de metoda Southern, la metoda amplificării prin PCR proba de DNA iniţial poate proveni de la o singură celulă. Din acest considerent metoda amplificării prin PCR este indicată pentru "detectarea" secvenţelor foarte puţin reprezentate într-un eşantion biologic, e.g.: clone celulare leucemice, particule virale, diagnosticul genotipic, DNA genomic, DNA mitocondrial (Kaplan şi Delpech, 1990; Sittman, 1994).

Metoda PCR permite şi investigarea mRNA a cărui analiză prin metoda Northern este, în toate situaţiile, destul de anevoioasă. In cazul studierii mRNA, într-o primă instanţă se sintetizează o moleculă de cDNA monocatenară utilizându-se reverstransriptaza. Pentru aceasta se utilizează un primer antiseus care se hibridizează specific la extremitatea 3' a mRNA care prezintă interes pentru investigare. In continuare este sintetizată, cu ajutorul DNA polimerazei, catena complementară de DNA. In acestă manieră se obţine DNA dc. Din acest moment se poate proceda la utilizarea propriu zisă a metodei PCR în scopul amplificării fragmentelor de DNA dc în cadrul unor runde repetitive (cicluri) de sinteză.

Accesibilitatea metodei de amplificare prin PCR cunoaşte şi limite, condiţionate de lungimea fragmentului amplificabil, deci a DNA iniţial. Astfel amplificarea fragmentelor de 100-1000 nucleobaze este relativ facilă. Se estimează că limita superioară a lungimii fragmentelor amplificabile este de 3000 nucleobaze (notat uzual 3 kb) pentru considerentul că la mărimi crescute scade randamentul amplificării.

Detalii asupra metodei PCR a utilizărilor practice ale acesteia se pot afla în literatura de specialitate apărută în ultimii ani (Kaplan şi Delpech, 1990; Watson et al 1992; Griffiths et al. 1993; Davidson şi Sittman, 1994).

6.6.2.2. Investigarea DNA cu metoda amplificării prin PCR

In biologia moleculară investigarea fragmentelor de DNA amplificat se poate face prin diverse metode analitice:

- *Secvenţializarea.* În cazul fragmentelor de DNA amplificat, secvenţializarea se poate efectua prin metoda Sanger cu ajutorul dideoxiribonucleotidelor i.e., dideoxinucleosidtrifosfaţi ddNTP. In această situaţie amplificarea prin metoda PCR şi secvenţializarea prin metoda Sanger se asociază şi se aplică succesiv (Arnheim şi Ehrlich, 1992).

Astfel, în genetică, prin metode specifice biologiei moleculare se poate proceda, la repararea mutaţiilor punctuale vizând o pereche de nucleobaze din dcDNA genomic (pereche modificată prin mutaţie). e.g.: A=T sau G=C. Un astfel de studiu se face prin aşa numita "analiză de amplificare-secvenţializare". (Kaplan şi Delpech, 1990).

- *Electroforeza.* Se aplică la fragmentele de DNA secvenţializate, aflate într-o cantitate suficient de mare pentru a permite vizualizarea prin fluorescenţă în prezenţa bromurii de etidium. Acest procedeu oferă posibilitatea studiului direct (fără hibridizare) a variaţiilor întâlnite la alele.

Alela (gr.allelon - un altul, o alta) este definită ca o versiune alternativă a aceleiaşi gene care diferă prin secvenţa nucleotidelor (i.e. a nucleozidmonofosfaţilor: NMP) constituenţi. Noţiunea de alele - prin extincţie - desemnează şi variantele de DNA noncodant dispuse în acelaşi locus (i.e. polimorfism anonim).

Termenul de *"alelă"* este sinonim cu acela de *" structură alelomorfă"* (gr. allelen - o alta; morphe - formă). Structura alelomorfă - în tratatele de specialitate mai vechi (în deosebi în Biologia celulară şi Citogenetică) - defineşte o genă alternativă sau o serie de gene alternative care pot ocupa acelaşi "locus genic" şi care controlează expresii genice diferite ale aceluiaşi caracter.

In natură se disting, obişnuit, "sisteme di-alele" şi, în anumite cazuri, "sisteme multi-alele". In "sistemele multi-alele" cunoscute şi sub denumirea de "alelomorfism multiplu" există trei sau mai multe gene alternative pentru acelaşi locus.

Aceste variaţii prezente la alele studiate cu ajutorul electroforezei, pot atesta că fragmentul de DNA amplificat este sediul unor variaţii ale polimorfismului de restricţie.

- *Identificarea prin sonde moleculare.* Este o metodă asociată amplificării DNA reprezintă un procedeu performant aplicat de asemenea în studiul mutatiilor punctuale.

Procedeul este cunoscut în literatura de specialitate sub numele de "procedeul dot-blot". Acest procedeu rezidă în depunerea eşantionului de DNA amplificat pe un filtru şi hibridizarea directă cu sonde moleculare.

Sondele moleculare prezintă avantajul de-a avea specificitate de fragment şi reactivitate în raport cu fragmentul de DNA genomic cercetat. Procedeul de identificare prin sonde (procedeul dot-blot) se pretează la detectarea mutaţiilor punctuale rezultate prin erori ale "împerechierii" nucleobazelor. In astfel de situaţii se utilizează minisonde (oligosonde) adecvate corespunzătoare alelelor normale şi alelelor rezultate prin mutaţii.

6.6.3. APLICATII ALE METODEI DE AMPLIFICARE PRIN PCR

Metoda de amplificare prin PCR are remarcabile utilizării În diagnostic, medicina legală, selecţia genotipurilor etc.

6.6.3.1. Aplicatii în diagnostic

In problemele diagnosticului această metodă se utilizează în patologia eredităţii (eredopatologie) şi în patologia bolilor infecţioase.

6.6.3.1.1. Aplicatii în eredopatologie

Aceste aplicaţii se bazează pe faptul că genele în care au apărut mutaţii pot să se afle la originea unor boli. Din aceste considerente fragmente de DNA genomic interesând patologia, sunt amplificate şi secvenţializate.

In eredopatologie, spre exemplu, se poate proceda la diagnosticul genotipic al anemiei falciforme afecţiune care conduce la modificarea formei globulelor roşii urmate de tulburării ale funcţiei oxiforetice şi ale metabolismului hemoglobinei. Pentru investigarea anemiei falciforme un fragment de DNA genomic este amplificat cu ajutorul a doi primeri. Aceşti primerii încadrează o regiune care conţine 6 codoni ai β-globinei. Se utilizează o enzimă de restricţie Oxa NI, care va produce secţionarea la codonul normal (alela bA) şi va determina formarea a două fragmente polinucleotidice de 121 pb, respectiv 103 pb (Kan, 1987). In cazul mutaţiei A — T caracteristică pentru alele bS. Se vor observa modificări structurale ale fragmentelor secţionate. Superscriptul S semnifică notaţia sicle - S pentru

anemia falciformă (engl. sicle - seceră) - termen care aminteşte de forma hematiilor în cazul acestor afecţiuni.

In investigaţie se procedează la: amplificarea moleculei DNA; electroforeza (în gel poliacrilamidă); hibridizarea cu sonde moleculare marcate; evaluarea prin reacţii de culoare: reacţia cu bromura de etidium şi fluorescenţă (pentru fragmentele de DNA) şi/ sau reacţia cu clorura de argint (pentru fragmente de DNA şi pentru proteinele prezente, eventual, ca impurităţi).

In practica laboratoarelor de biologie moleculară şi chiar a laboratoarelor clinice (cu secţie de biologie moleculară) care deservesc Clinici de obstretică şi ginecologie există posibilitatea prognosticuluui unor boli congenitale cu determinism genetic (Papp, 1990).

6.6.3.1.2. Aplicatii în oncologie

In oncologie se procedează la decelarea celulelor canceroase. In astfel de investigaţii există o non-concordanţă în relaţia primer-fragment DNA mc. In oncologie metoda a fost aplicată în cazul limfomului care este cauzat de translocaţii inter-cromozomiale (vizând cromozomii 14 şi 18). In acest caz în urma fiecărui ciclu în amplificarea DNA polimerazei se vor produce fragmente de mărime diferită (Watson et al, 1992). Aplicarea metodei amplificării prin PCR în oncologie se poate preta pentru monitorizare în oncoterapie. Acest fapt poate fi de apreciabilă utilitate pentru orientarea conduitei clinice în chimioterapia şi radioterapia oncostatică.

6.6.3.1.3. Aplicatii în detectarea infectiilor

Metoda de amplificare prin PCR se pretează, de asemenea, pentru detectarea infecţiilor bacteriene şi virale. Aplicarea metodei este importantă pentru rapiditate şi acurateţe în stabilirea diagnosticului. Se exemplifică în acest sens aspecte din microbiologie şi virusologie.

In microbiologie se poate proceda la stabilirea diagnosticului în tuberculoză, afecţiune produsă de Mycobacterium tuberculosis. In raport cu metoda microbiologică de creştere microorganismelor în culturi, metoda amplificării prin PCR oferă rapiditate şi acurateţe. In acest caz sunt necesari primeri cu specificitate pentru anumite gene microbiene. Uneori precizia trebuie să meargă mai departe interesând suşa (tulpina) care urmează a fi identificată.

In virusologie metoda de amplificare prin PCR s-a impus utilizării în diagnosticul pentru boala numită SIDA (fr. Syndrome Immunodéficitaire Acquérit) sau AIDS (engl. Acquired Immunodeficiency Syndrome). Virusul cauzator, cunoscut sub numele de "virusul imunodeficienței umane", abreviat prin acronimul HIV (Human Immunodeficiency Virus) are un genom cu RNA (deci este un ribovirus). In caz de infecție cu HIV (la care se cunosc tipurile HIV1 și HIV2), celula eucariotă umană devine celula-gazdă a acestui virus. Metoda PCR implică utilizarea reverstranscriptazei pentru obținerea fragmentului de DNA. Diagnosticul SIDA, bazat pe metoda amplificării prin PCR, are avantajul de-a asigura rapiditate, acurateţe și o mai mare selectivitate permițând detectarea în fazele incipiente când este afectat un număr redus de celule.

6.6.3.2. Aplicatii în medicina legală

Prin facilitățiile modului operator (i.e. tehnica de lucru), metoda amplificării prin PCR se pretează, de asemenea, utilizării în medicina legală și în chimia judiciară.

Din aceste considerente în terminologia științifică a fost acreditată expresia de "amprente DNA", similar cu noțiunile de "DNA fingerprint" - în limba engleză și "empreinte génétique" - în limba franceză.

Utilizarea metodei PCR în obținerea unor rezultate care pot fi administrate ca probe juridice se bazează pe cunoașterea structurii, topobiochimiei și relației structură chimică- activitate biologică la DNA. In acest context se remarcă regiuni hipervariabile din DNA mitocondrial obținut din sânge, material seminal (spermă, părul victimelor sau suspecților. Acest DNA poate fi amplificat prin metoda PCR și secvențializat (Sittman, 1994). Deci se poate afirma că investigațiile deastfel se bazează pe polimorfismul DNA mitocondrial.

In practica laboratoarelor de medicină legală și chimie judiciară se procedează la recoltarea de probe de la victime (crime, violuri) și de la suspecți.Pentru investigarea probelor se utilizează de obicei "Kituri pentru PCR" puse la dispoziție de laboratoare de profil- adesea aparținând unor concerne specializate.

Cu referire la utilizarea metodei amplificării prin PCR pentru furnizarea de probe - de interes juridic sau rezultate -de interes medical, este necesară menționarea faptului că adesea probele prelevate pentru investigare trebuie prezervate de riscul de contaminare atât în cursul prelevării cât și în cursul investigației în laborator.

6.6.3.3. Aplicatii în ginecologie

In domeniul ginecologiei metoda amplificării prin PCR se poate utiliza pentru stabilirea sexului la produsul de concepție chiar din stadiul embrionar.

Se reiterează unele informații privind particularitățile cromosomilor umani menționându-se că există 46 cromosomi din care: 44 - autosomi şi 2 gonosomi (cromosomi ai sexului). In structurile cromosomiale la sexul feminin există gonosomii XX, iar la sexul masculin gonosomii XY.

Faptul că la sexul masculin există doar cromosomul Y facilitează aplicarea, cu succes a metodei de amplificare prin PCR pentru diagnosticarea sexului.

6.6.3.4. Aplicatii în cartarea genomului

Datorită facilităților legate de cuantumul redus al probei, reproductibilitate, rapiditate şi acurateţe, metoda amplificării prin PCR s-a impus destul de repede fiind utilizată în prezent şi pentru studiile asupra genomului.

Astfel de investigații s-au efectuat asupra genomului uman interesând particularitățile relației genă-morbiditate. Pentru aceasta s-au studiat regiunile cromosomiale p şi q la fiecare cromosom şi, treptat, s-au stabilit corelații între regiunile cromosomiale şi morbiditate (Mc Kusick, 1988). In prezent există cataloage privind "anatomia morbidității genomului uman", care se referă la diverse afecțiuni.

De asemenea, s-au intreprins şi studii asupra genoamelor la plante - interesând agricultura şi la animale interesând zoocultura şi patologia medicală veterinară.

In domeniul zooculturii s-a urmărit corelația genă - producţie animală. Astfel s-au putut stabili fragmente de DNA determinate pentru anumite genotipuri, e.g.: b-lactoglobulină în corelaţie cu cantitatea crescută de lapte la homozigotul AA şi cantitatea crescută de lipide şi cazeină din lapte - la homozigotul BB; K-cazeină în corelaţie cu cantitatea crescută de lapte. Remarcabil este faptul că investigarea DNA genomic, cu ajutorul metodei amplificării prin PCR, s-a făcut din probe animale prelevate din sânge sau din bulbi piloşi. Astfel de investigații evident corelate cu alte studii asupra geno- şi fenotipurilor pot fi utile pentru orientarea conduitei în selecția animalelor.

Alături de astfel de studii interesând zoocultura în investigarea genomului animal se impune şi studiul aspectelor legate de morbiditate, interesând în mod direct patologia medicală veterinară precum şi zoocultura.

In domeniul biologiei moleculare vegetale, metoda amplificării prin PCR, deşi deosebit de importantă, se impune mai greu. Una din cauze este reprezentată de particularităţile morfologice şi de compoziţie a membranei celulare, care face uneori dificilă investigaţiile. Alte cauze care trenează implementarea acestei metode sunt dependente de obiectivele propuse. In acest sens se impune menţionarea faptului că în agricultură, ca şi în zootehnie, interesul este polarizat atât spre aspectul productiv-ameliorarea, cât şi spre aspectul patologic-fitopatologia. Aceasta din urmă necesită raportare la acţiunea factorilor nocivi de proveniență chimică (apa, compuşii minerali), fizică (radiaţii ionizante şi ultraviolete), biologică (virusuri, microorganisme patogene etc.).

Toate aceste motivaţii explică progresele mai lente, totuşi importante şi implementarea mai dificilă a metodei amplificării prin PCR în biologia moleculară vegetală. Dintre rezultatele pozitive se menţionează stabilirea corelaţiei dintre modificările DNA genomic şi atributele fenotipice de interes productiv, e.g.: relaţia DNA genomic-masă vegetală relaţia DNA genomic-azot proteic, studiată mai intens la plante leguminoase.

6.7. METODA EVALUARII POLIMORFISMULUI LUNGIMII FRAGMENTULUI DE RESTRICTIE (RFLP)

6.7.1. PRIVIRE SINOPTICA

Metoda evaluării polimorfismului de restricţie se aplică pentru moleculele de DNA şi se bazează pe posibilitatea realizării unui cuplu de tipul sondă moleculară/enzimă de restricţie. Un astfel de cuplu permite realizarea corespondenţei cu un amplasament strict definit pe DNA genomic, deci corespunzător unui "locus" genetic.

Polimorfismul lungimii fragmentului de restricţie al DNA defineşte variaţiile individuale ale fragmentelor de DNA şi permite relevarea diferenţelor în cadrul "fragmentelor de restricţie" obţinute cu o sondă moleculară dată şi cu o enzimă de restricţie.

In literatura de specialitate de limbă franceză, metoda este cunoscută sub numele de "méthode des polymorphismes de restriction des variations individuelles de la séquence de DNA", i.e. metoda polimorfismelor de restricţie ale variaţiilor individuale pentru secvenţa de DNA, iar în literatura de limbă engleză metoda este cunoscută sub denumirea de *"Restriction Fragment Length Polymorphism"*, i.e. polimorfismul lungimii fragmentului de restricţie, notat abreviat prin acronimul RFLP. In prezent această abreviere

este general acreditată pe plan internaţional, fiind utilizată în mod curent în literatura de specialitate din diverse ţări.

Pentru caracterizarea RFLP se are în vedere variabilitatea fragmentelor de restricţie de la un individ la altul şi transmisia mendeliană a acestora. Din aceste considerente RFLP este estimat ca un **marker genotipic**. Diferitele versiuni corespunzând aceluiaşi amplasament în genom (i.e. un locus genetic) sunt exclusive una faţă de alta în acelaşi cromosom, deci sunt alele. In cazul heterozigoţilor, existând alele net diferite, se poate considera că există markeri genotipici codominanţi. In acest context se poate afirma că fiecare sistem alelic de restricţie poate fi definit ca un "locus genetic polimorf".

Metoda evaluării RFLP s-a aplicat pentru prima dată la om pentru genele globinei (Kan, 1978). Ulterior s-a constatat că RFLP poate fi intragenic sau extragenic. Prezenţa primului RFLP extragenic (denumit "anonim") a fost descrisă la locusul DXS14 (Wyman şi White, 1980 - citaţi de Kaplan şi Delpech, 1990). In acest mod s-a putut remarca faptul că sub o aparentă constanţă, genomul uman este - asemănător altor specii - sediul unor variaţii individuale ale secvenţelor din DNA. In marea majoritate a cazurilor acestea sunt neutre şi nu perturbă "mesajul ereditar".

Studii efectuate în deceniul 1980-1990 au urmărit posibilitatea de investigare prin metoda evaluării RFLP - considerată ca o metodă de analiză a linkajului - în raport cu modificările apărute în secvenţele din DNA genomic în raport cu diverse stări de boală (Lewin, 1990).

6.7.2. PRINCIPII METODOLOGICE

Considerată ca o metodă de analiză şi evaluare a linkajului, metoda RFLP s-a impus în Biologia moleculară datorită acurateţei şi a performanţelor aplicative care se extind pe un larg domeniu de la stadiul genomului până la evaluarea modificărilor de interes biomedical.

Metoda se bazează, aşa cum s-a arătat, pe existenţa variaţiilor ereditare (genotipice) individuale în fragmentele de DNA - care caracterizează atributul numit, cu un termen generic "polimorfism". Acest polimorfism poată să apară în:

a) fragmentele de DNA cu secvenţe codificate - situaţie în care există la variaţii genetice sau stări de boală în cadrul populaţiei (deci cu variaţii fenotipice);
b) fragmente de DNA cu secvenţe necodificante - circumstanţă în care există polimorfismul, dar nu se observă variaţii fenotipice. Si în această situaţie, arată

Sittman (1994), este posibilă decelarea polimorfismului. Astfel, o modificare în fragmentul de DNA - vizând unele secvenţe de dNMP (deoxiribomononucleotidfosfaţi) - poate fi urmată de câştigarea sau pierderea unui loc de recunoaştere a unei enzime de restricţie (este aşa numitul polimorfism al locusului de enzimă restrictivă). Astfel de situaţii pot fi decelate prin aplicarea asociată a două metode de investigare: metoda evaluării RFLP şi metoda de secvenţializare Southern.

In general se poate afirma că metoda de evaluare a RFLP poate fi bine pusă în evidenţă asociind acesteia metoda de secvenţializare Southern sau metoda de amplificare prin PCR (Kaplan şi Delpech, 1990).

Cu privire la cuplul sondă moleculară/enzimă de restricţie se impune menţionarea unor aspecte particulare.

Astfel, cu privire la **sondele moleculare** utilizate se impune menţionarea faptului că acestea pot fi:

- sonda de DNA genomic (sonda genică) - care corespunde unei gene sau fragment de genă, i.e. locus explorabil. Sonda genică permite punerea în evidenţă a RFLP exonic şi intronic;
- sonda de DNA genomic anonim (sonda anonimă) - corespunzătoare unui locus explorabil implicat (curent) în patologia moleculară. Sonda anonimă permite punerea în evidenţă a RFLP extragenic;
- sonda de cDNA - are utilizare limitată. Aceasta nu poate pune în evidenţă decât RFLP exonic sau juxta-exonic.

Referitor la enzimele de restricţie utilizate, se menţionează că alegerea acestora are adesea caracter arbitrar. Totuşi au prioritate anumite enzime care au în "situsul de recunoaştere" dubletul CG. In acest dublet este posibilă metilarea preferenţială a citozinei care, apoi, prin dezaminare realizează mutaţia ^{m}C — T. Astfel, de la dubletul CG se poate ajunge la dubletul TG. Urmărind relaţia enzimă-situs de recunoaştere se pot menţiona câteva enzime de restricţie şi situsurile de recunoaştere ale acestora. Se menţionează enzime cu eficienţă mai mare: Taq I - cu situs TCGA ; Hind III - cu situs AAGCTT şi enzime cu eficienţă mai redusă: Rsa I - cu situs GTAC; Bam HI - cu situs GGATCC. Se remarcă eficienţa mai mare la enzime care au situsuri cu dublet CG.

Pentru a avea o imagine mai completă asupra cuplurilor sondă moleculară/ enzimă de restricţie sau simplu sondă/enzimă în tabelul 6-1 se prezintă câteva date compilate din literatura de specialitate (după Kaplan şi Delpech, 1990).

Tabel 6-1: Cupluri sondă/enzimă pentru investigarea RFLP dialelic (după Kaplan şi Delpech, 1990)

Sondă / Enzimă	Locus explorat	Cromosom	Alele în kb	Frecvenţa alelelor
Sonde genetice				
pPHT72 / msp I	Fenilalaninhidroxialză	12	23,0 / 19,0	0,44 / 0,56
pSsta2 / Sac I	- globina	16	3,5 / 2,4	0,50 / 0,50
F8A/ Bel I	Factor VIII C	X	1,2 / 0,9	0,3 / 0,7
Sonde anonime				
G8 / Hind III	Coree Hutington	4	17,5 / 15,0	0,79 / 0,21
pXV.2c / Taq I	Mucoviscidoza	7	2,1 / 1,4	0,47 / 0,53
p ERT87.1 / Xmn I	Miopata Duchenne	X	8,7 / 7,5	0,69 / 0,31

In afară de cazul polimorfismului di-alelic în practică se mai examinează şi polimorfismul multi-alelic. In cazul unui sistem multi-alelic utilizarea metodei evaluării RFLP este mai complexă. Intr-un sistem multi-alelic apare un polimorfism de rearanjament sau de repetiţie. Numărul de repetiţii variază de la un individ la altul şi această variaţie modifică simultan "harta de restricţie" a enzimelor. Juxtapunerea secvenţelor repetate favorizează crossing overul şi conduce la expansiunea sau la contracţia a numeroase copii apărute ca o "repetiţie în tandem". Aceste regiuni nou formate sunt cunoscute în literatură sub numele de "minisateliţi". In literatura de limba franceză se definesc ca "minisattelites hypervariables", iar în literatura de limba engleză ca "Variable Number of Tandem Repeats" abreviate prin VNTR.

Sub raport structural se distinge un DNA minisatelit, constituit din câteva kilobaze (uneori zeci de kilobaze), dispuse ca o aglomerare de secvenţe repetate în tandem. Datorită acestei structuri DNA minisatelit are un înalt grad de informativitate.

Astfel, moleculele de DNA minisatelit - diseminate în structurile cromosomiale - sunt considerate marcheri genotipici de precizie, utile în investigarea genomului.

6.7.3. APLICATII ALE METODEI DE EVALUARE A RFLP

In practica din domeniul Biologiei moleculare, având în vedere caracterul de markeri genotipici codominanţi pentru fragmentele de DNA, metoda RFLP se pretează în investigaţii de acurateţe privind:

- cartarea genomului uman;
- diagnosticul bolilor genetice monofactoriale;
- verificare a monoclonalității în proliferările celulare;
- analiza anomaliilor de disjuncție cromosomială;
- controlul receptării grefelor (riscul la rejetul de grefă);
- aprofundarea problematicii bolilor poligenice;
- decelarea de gene noi în direcția aplicării "geneticii inverse"
- identificarea indivizilor (organisme şi celule), i.e. amprenta DNA.

Numeroasele aplicații ale metodei RFLP sunt justificate de rigoarea cu care se pot identifica fragmentele de restricție din DNA genomic. Determinările pot viza o genă, dar pot ajunge până la identificarea unui locus genic (denumit adesea, impropriu, "locus genetic"). Prin necesitatea realizării - în cursul investigațiilor - a unor cuplaje de tipul sondă moleculară/enzimă de restricție se asigură caracterul permanent şi acuratețea metodologică. Din aceste considerente metoda evaluării RFLP cunoaşte o continuă extindere de la laboratoarele de biologie moleculară spre laboratoare cu profil de: genetică medicală, chimie clinică (ca asistență pentru pentru clinici de: ginecologie, chirurgia transplantelor, oncologie), genetică vegetală şi animală, medicină legală etc.

Din pleiada aplicațiilor menționate mai sus - toate importante prin specificul interdisciplinar, ca şi prin utilitatea teoretică şi practică - datorită spațiului redus rezervat acestui volum, ne vom limita doar la unele probleme referitoare la genetica inversă şi amprenta DNA. Acestea vor fi discutate, succint, în continuare.

6.7.3.1. Genetica inversă

Genetica inversă reprezintă un domeniu de avangardă al biologiei moleculare dezvoltat în deosebi după anii '80 şi impus, relativ repede, de stringențele cercetărilor biomedicale şi aplicabilității în medicina preventivă.

Strategia aplicată în genetica inversă (engl.reverse genetics; fr. génétique inverse) are o logică proprie care abordează obligatoriu gena în cauză şi încearcă elucidarea a relației genă - stare morbidă pentru a prospecta perspective terapeutice (Orkin, 1987). Această nouă abordare s-a întrevăzut după 1980 şi poate viza boli genetice monofactoriale grave (e.g.: mucoviscidoza, miopatia Duchenne, coreea Huntington).

Deci, se poate conchide că în raport cu *"genetica uzuală"* (obişnuită) - denumită curent "genetica clasică" - bazată pe studii care pornesc de la efectele fenotipice spre genă, în *"genetica inversă"* - se urmăresc particularitățile modificărilor genice care se corelează cu efectele fenotipice morbide (Rowland, 1988).

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Progresele în genetica inversă au fost facilitate de posibilitatea de-a efectua aşa numitul *"diagnostic genotipic"*. Practicarea acestui diagnostic s-a asigurat prin aşa numitul diagnostic prenatal (în ginecologie), diagnostic pre-simptomatic (în oncologie, patologia unor boli neuro-musculare).

Dezvoltarea geneticii inverse a devenit posibilă datorită perfectării metodei de evaluare a polimorfismului lungimii fragmentului de restrictie - RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism) care localizează DNA în genom.

O reprezentare a căilor specifice de abord în genetica uzuală şi în genetica inversă se prezintă în fig. 6-16. Se remarcă faptul că în genetica uzuală explorarea unei anumite stări morbide se face în raport cu fenotipul - diagnosticul se raportează la aspectele dismorfogenezice (morfopatologie) şi dishomeostazice (fiziopatologie). In genetica inversă investigarea porneşte de la fenotip - explorarea morfo- funcțională se bazează pe diagnosticul genotipic, care poate avea caracter predictiv.

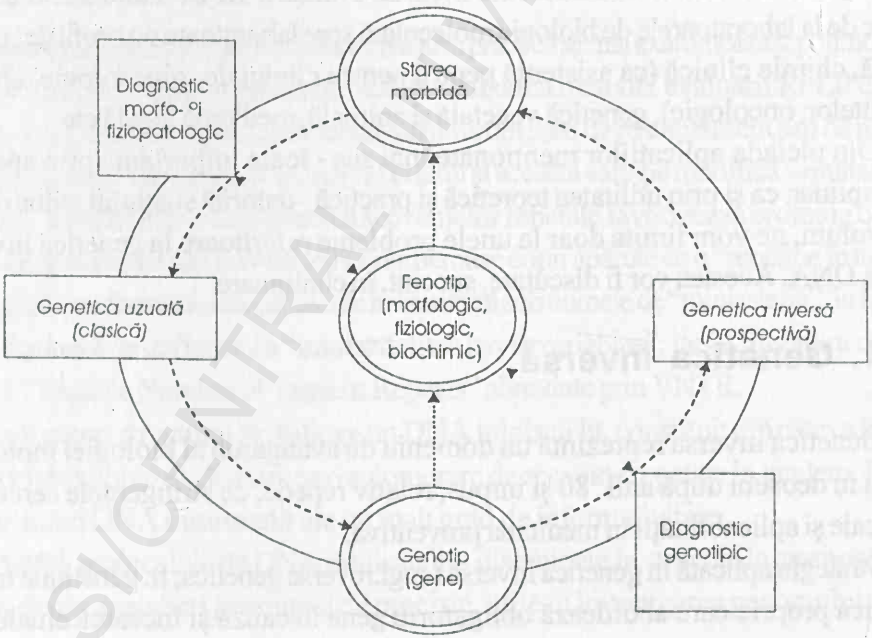


Fig.6-16. Căi de abord specifice pentru genetica uzuală şi genetica inversă (Gârban, 1994)

Strategia geneticii inverse - în accepția dată de Kaplan şi Delpech (1990) - poate prezenta cinci etape distincte:

BCUIASI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

1) Decelarea legăturii genetice între un locus morbid (studiat pe o anumită genă) şi un marker genotipic reprezentat de RFLP. In acest scop se folosesc sonde anonime - constituite din fragmente scurte de DNA - care pot stabili distanţa genetică (de fapt genică) între locusul morbid şi RFLP. Exprimarea acestor distanţe se face în centiMorgani (cM) estimându-se că o distanţă genetică de 10 cM corespunde unei distanţe fizice în genom de cca 10.000 kb (cu un risc de eroare de cca 10%);
2) Localizarea cromosomului pentru primul marker genotipic la care s-a decelat o legătură semnificativă, e.g.: în cazul mucoviscidozei cu sonda DOCRI 917 - localizarea s-a făcut la cromosomul 7; în cazul coreei Huntington cu sonda G 8 - localizarea s-a făcut la cromosomul 4;
3) Delimitarea locusului - urmăreşte în continuare încadrarea "teritorială" într-o anumită regiune a cromosomului. Deci, se urmăreşte precizarea distanţei locus morbid-marker genotipic (RFLP) şi circumscrierea încadrării.
4) Investigarea heterogenităţii genetice - reprezintă o etapă în care se studiază problema afectării unui locus sau a mai multor loci. In astfel de cazuri s-a propus evaluarea heterogenităţii prin măsurarea distanţei genetice (de fapt genice) în raport cu un interval de separare a doi markeri genotipici şi nu în raport cu o singură zonă (parte) polimorfă. Studiile asupra heterogenităţii genetice au arătat că localizarea genetică a unui locus morbid, prin metoda evaluării RFLP, este importantă demonstrând existenţa a două aspecte distincte: a) afecţiune unică, dar care poate viza gene diferite (non-alelice) şi evident locusuri diferite, e.g.: psihoza maniaco-depresivă, care are o genă specifică în cromosomul 11 (notaţia localizării 11pter - gena tirosin-hidroxilazei) şi o genă secundară în cromosomul X (necunoscută încă); b) afecţiuni diferite care interesează aceiaşi genă, deci acelaşi locus morbid, e.g.: miopatia Duchenne - cu apariţie mai timpurie şi evoluţie lentă şi miopatia Becker - mai tardivă ca apariţie, dar cu evoluţie mult mai rapidă, ambele vizând o genă unică şi un singur locus din cromosomul X (notaţia localizării Xp21.2 - gena distrofinei).
5) Evoluţia de la locus la genă - reprezintă ultima etapă şi urmăreşte corelarea rezultatului obţinut prin metoda de evaluare a RFLP,prin care s-a evidenţiat existenţa unui locus, cu încadrarea acestuia, deci cu definirea genei. Etapa este laborioasă pentru studiul prin metodele specifice biologiei moleculare. Din acest considerent s-a propus orientarea spre aşa numitele "teste funcţionale" care rezidă în decelarea unor proteine ca produşi finali ai activităţii genei. Reluând un

exemplu dat la etapa (4) se poate cita: investigarea distrofinei - în cazul afectării genei Xp21.2 (pentru miopatiile menţionate mai sus).

Datele expuse mai sus şi etapele prezentate, cu unele exemplificări, atestă faptul că facilităţile create de genetica inversă prin posibilitatea instituirii unui "diagnostic genotipic" sunt laborioase, dar conferă acurateţe şi reproductibilitate în investigaţiile de laborator.

6.7.3.2. Amprenta DNA

Amprenta DNA poate fi definită ca o expresie unică a fragmentelor de DNA caracteristice unui organism (pro- sau eucariot) şi chiar a unei celule eucariotice. In limba română se utilizează, mai rar, şi expresia de "amprentă genetică".

Decelarea amprentei DNA (engl.DNA fingerprint; fr.empreinte genetique) este posibilă printr-o variantă a metodei de evaluare a polimorfismului lungimii fragmentului de restricţie (RFLP) concomitent cu aplicarea metodei Southern.

Perfectarea metodei a fost posibilă datorită polimorfismului multi-alelic în care apar - după cum s-a arătat - "formele repetitive", variabile (repetiţie în tandem) de la un individ la altul. Numărul variabil al repetiţiilor în tandem acreditat în literatura de specialitate prin acronimul VNTR - (Variable Number of Tandem Repeats) permite evaluarea locilor deosebit de polimorfi din aşa numitele regiuni hipervariabile ale DNA genic.

Prezenţa şi mărimea repetării se decelează prin metoda Southern (Southern blot), apoi se procedează la hibridizarea cu o sondă complementară secvenţei repetitive.

Numeroasele repetări din diferiţi loci cu regiuni hipervariabile - notat HVRS (hipervarible regions) relevă un înalt grad de omologie în cadrul unei secvenţe centrale. Probele acestor loci, care împart o secvenţă centrală comună, sunt denumite - probe multi-locus.

Spre deosebire de acestea există probe uni-locus în care hibridizarea are loc doar cu o singură (unică) regiune hipervariabilă - notată HVR.

Probele multi-locus au fost descoperite de cercetătorul englez Jeffreys (1984), care a denumit metoda "DNA fingerprinting" (amprentei DNA). Metoda a făcut posibilă utilizarea pentru prima dată a polimorfismului DNA în domeniul medicinei legale.

Unicitatea (singularitatea) regiunilor hipervariabile (HVRS) atestă gradul înalt de variabilitate genică individuală şi poate servi ca amprentă DNA specifica fiecărui individ.

Practic se estimează că două probe multilocus vizualizate pe un suport de gel-electroforeză pot prezenta identitate doar în proporţie de 1 caz din 69.106 studiate.

Pentru investigații în domeniul medicinei legale se folosesc sonde mono-locus, care fac obiectul unor brevete de utilizare (exclusivitatea este deținută de Compania "Cellmark Diagnostics" din Marea Britanie).

Sondele mono-locus au o mare capacitate de discriminare a amprentei DNA. Din aceste considerente se folosesc în medicina legală pentru investigarea filiației și în criminologie. Se observă că reîntâlnim problematica așa numitului "geniu genetic" care punea problemele: DNA-filiație; DNA- individualitate.

In investigarea filiației se poate urmări testul parentalității (de fapt în practică se urmărește testul paternității),procedându-se la excludere sau confirmare. De asemenea, problema filiației se pune în unele cazuri de emigrație-imigrație, privitoare la persoane care ridică probleme juridice.

In criminologie metoda amprentei DNA este utilizată nu numai pentru discriminare - în cazul disculpării unei persoane suspecte, dar și pentru incriminare. Spre exemplu, au fost investigate pe baza amprentei DNA, urme biologice (sânge, fire de păr, resturi de țesut) rămase la locul crimei de la persoane suspectate ab initio. Din punct de vedere al biochimiei s-a făcut remarca faptului că spre deosebire de proteine care se degradează rapid, resturile (probele) biologice cu conținut de DNA rezistă mai mult timp, fiind mai greu degradabile.

6.8. RECOMBINAREA GENICĂ - SINOPTIC

In prezent, în biologia moleculară se utilizează curent metode prin care se urmărește "recombinarea genetică".Pentru o exprimare de acurateţe vom prefera să utilizăm formularea "recombinare genică". Aceasta exprimă mai corect substratul molecular.

Recombinarea genică, în principiu, se poate realiza prin izolarea unei anumite gene, bine definită în ansamblul genomului. După izolare se urmărește purificarea, amplificarea și eventual, funcționalitatea acestei gene. Aspectul de funcționalitate vizează producerea unei proteine de interes medical sau biologic.

Prin recombinarea genetică se poate realiza transferul interspecific al genelor. Acest transfer al genelor de la o specie la alta se realizează prin metode speciale, utilizând ca vectori (mijloace de transport) plasmide, bacteriofagi (virusuri bacteriene) sau cosmide. In transferul de gene - poate barierele de specie - se uzitează de două tipuri de enzime de elecție:

1) enzime de restricție (ER), care "secționează" în fragmente macromoleculare de acizi nucleici;
2) ligazele care "sudează" fragmente din macromolecule de acizi nucleici.

BCU "CAROL I" CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Modul de realizare al transferului genelor de la o specie la alta face obiectul domeniului modern al "tehnologiei DNA recombinant". Această problemă de biologie moleculară va fi expusă într-un capitol special. In continuare se prezintă câteva aspecte generale privind utilizarea plasmidelor şi virusurilor în transferul de gene.

6.8.1. Transferul genelor cu ajutorul plasmidelor

Realizarea transferului de gene cu ajutorul plasmidelor implică existenţa a două faze preliminare:

a) prima rezidă în obţinerea unor fragmente de DNA genomic;

b) secunda în prepararea unor fragmente de DNA plasmidic.

Iniţial se procedează la obţinerea unei "bibloteci de DNA" (library of DNA), în care scop se porneşte de la un ţesut special prelevat sau de la un ansamblu de celule eucariote care conţin DNA genomic. Acesta este "secţionat" în fragmente mici cu ajutorul uneia sau mai multor enzime de restricţie (ER). Se obţine astfel un amestec cu numeroase fragmente din DNA genomic, denumite cu un termen generic "biblioteca de DNA".

Prepararea plasmidelor (fracţiuni constituite din DNA) prezintă similitudini cu prepararea DNA genomic. Plasmida (notată uneori prin p) este formată dintr-o moleculă de DNA circular, capabilă de replicare autonom care poartă una sau mai multe gene codante ale proteinelor şi poate asigură rezistenţa la diferite antibiotice.

Pornind de la aceste considerente se înţelege că prepararea plasmidelor implică "deschiderea" DNA plasmidic cu ajutorul enzimelor de restricţie. In cazul plasmidelor din Escherichia coli (E. coli) se foloseşte enzima de restricţie Eco R1.

In continuare, utilizând enzima DNA ligaza, devine posibilă formarea moleculelor circulare de DNA recombinant, conţinând fiecare plasmidă (DNA plasmidal) integrând şi un fragment de DNA genomic (fig.6-17). In mediul de lucru se formează totodată numeroase molecule care conţin fragmente de DNA diferite (discutarea acestui aspect depăşeşte interesul prezentului subiect).

Apoi DNA recombinant este trecut într-o cultură de celule de E.coli tratată cu săruri de calciu. Astfel creşte permeabilitatea celulelor care este facilitată trecerea moleculelor de DNA recombinant. In această manieră se realizează transfecţia în celule de E.coli.

Dacă procesul acesta are un randament scăzut se impune eliminarea celulelor care nu au încorporat plasmide (cunoscându-se că DNA recombinant conţinând plasmide). Pentru eliminarea acestui inconvenient se utilizează plasmide care au caracterul de

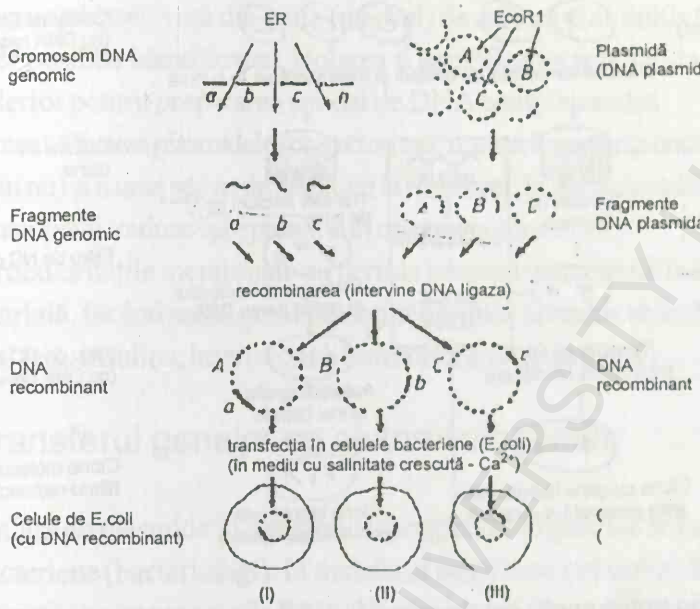


Fig. 6-17. Obținerea de DNA recombinat (explicații în text)

"rezistență la antibiotice" (antibiorezistență), cum ar fi - spre exemplu - rezistența la ampicilină, la oxacilină, la streptomicină ş.a.

Bacteriile (în speță E.coli) pot fi cultivate în prezența unui antibiotic, situație în care vor supraviețui doar celulele care au încorporat o plasmidă, posesoare a unei gene rezistente la antibioticul respectiv.

6.8.1.1. Procedeul de utilizare a DNA genomic

In cazul transferului de gene cu ajutorul plasmidelor se procedează la "incubarea" fragmentelor de DNA genomic de la eucariote cu DNA plasmidal de la plasmidele din Escherichia coli (după acțiunea enzimelor de restricție). După interacțiunea DNA genomic (i.e.: DNA cromosomal) cu DNA plasmidal se formează DNA recombinant.

În cazul că se urmăreşte în continuare, obținerea de clone se procedează la diluarea suspensiei de bacterii urmată de însămânțarea acestora în cultură pe un mediu special. Astfel, separate unele de altele, bacteriile vor creşte şi, fiecare va forma o clonă (fig. 6-18).

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

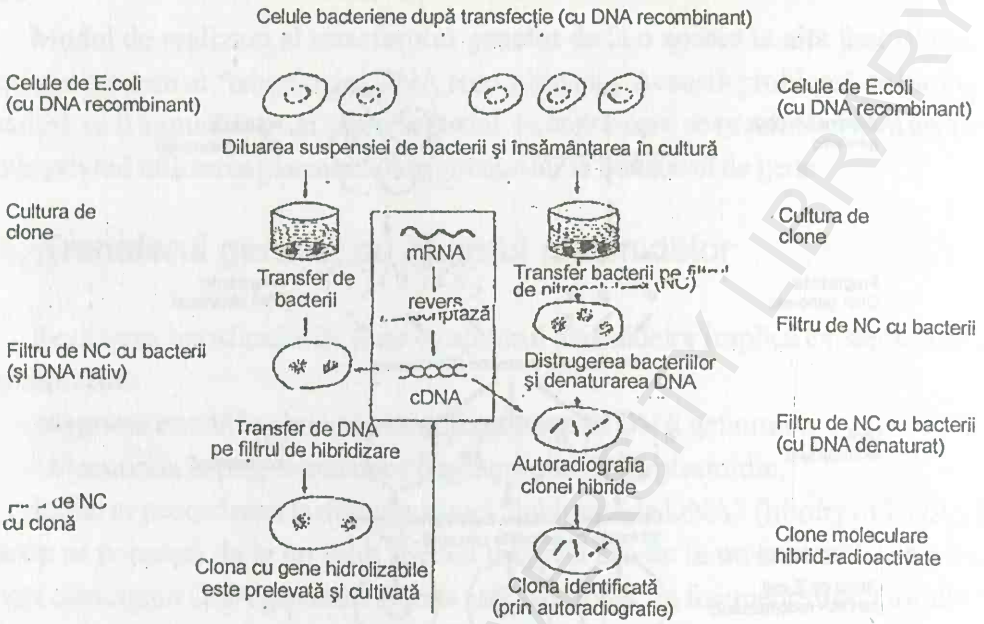


Fig. 6-18. Recombinarea genică - schema (explicații în text)

Conceptul de clonă în biologia moleculară definește ansamblul de celule-gazdă care provin de la o unică celulă gazdă. Celulele unei clone sunt identice în totalitatea lor. La rândul său, întreg ansamblul de celule poartă molecule identice de DNA recombinant.

O problemă de mare interes în biologia moleculară este aceea de identificare a clonei care include DNA recombinant, şi prin aceasta a plasmidei care conține gena al cărui studiu se urmărește. In acest scop se procedează la transferarea unui eşantion din fiecarae clonă pe un filtru de nitroceluloză.

6.8.1.2. Procedeul de utilizare a RNA mesager

Pe o altă cale, se poate utiliza RNA mesager transcris de gena a cărei izolare se dorește. Apoi cu ajutorul reverstranscriptazei se prepară DNA complementar (cDNA) utilizând precursori radioactivi. In continuare DNA radioactiv se transferă pe filtru de nitroceluloză şi se pune în condiții de hibridizare (prezența DNA polimerazei, ş.a.).

După separarea cDNA nehibridizat, se face autoradiografia. Granulele reprezentate în fig. 6-18 corespund DNA genomic hibrid sau cDNA radioactiv. S-au identificat, de asemenea, clone care conțin un fragment de DNA genomic, combinat cu DNA plasmidic.

In acest DNA se includ gene pe care dorim să le izolăm.

Clona este prelevată din cutia (mediul) de cultură şi se cultivă intensiv. Această operaţie face posibilă identificarea, izolarea şi amplificarea genei codante pentru mRNA, utilizată ulterior pentru prepararea sondei de DNA complementar.

Pentru utilizarea plasmidelor ca vectori este necesară existenţa unui promotor bacterian (inductor sau nu) şi a unei secvenţe de fixare la ribozomi. In aceste condiţii catenele de DNA complementar pot fi traduse spre proteine în organismul bacteriei.

Particularităţile menţionate au permis trecerea metodei de la faza de laborator la scara industrială, făcând astfel posibilă obţinerea unor proteine utile din punct de vedere bio-medical (e.g. insulina, interferonul, hormonul somatotrop ş.a.).

6.8.2. Transferul genelor cu ajutorul virusurilor

In afară de plasmide în transferul interspecific al genelor se pot folosi şi anumite virusuri bacteriene (bacteriofagi). In transferul de gene se pot utiliza bacteriofagi care se pretează inserţiei pe fragmente de DNA. Vectorii de tip bacteriofagic se utilizează adesea pentru secvenţializarea DNA prin metoda Sanger.

Cu ajutorul bacteriofagilor s-a procedat la transferul interspecific de gene de la bacterii la celule umane. Astfel, spre exemplu, s-au cultivat celule provenite de la om cu o maladie enzimatică (enzimopatie) - galactozemia. In această enzimopatie nu este posibilă metabolizarea monoglucidei galactoza, prezentă în diglucida lactoză (β-galactopiranozil-1-4-glucopiranoza). Această enzimopatie conduce la concentrarea galactozei în sânge (hipergalactozemia). Galactoza este metabolizată de către bacteria E. coli, care poate produce enzima B-galactozidaza (posedând gene care determină biosinteza acesteia).

Dacă se produce infectarea culturii de celule umane cu bacteriofagi, care în prealabil au infectat celule bacteriene de E.coli, se poate realiza transferul interspecific. In acest mod un bacteriofag - care s-a constituit în vector - a realizat transferul genelor de la celule de E.coli la celule umane pentru a asigura metabolizarea galactozei.

În general, cu privire la metodele specifice utilizate în Biologia moleculară se poate afirma că translaţia metodologică din domeniul cercetării ştiinţifice fundamentale în domeniul aplicativ, deci în sfera practicii, este extinsă treptat beneficiind de disponibilităţile comercializării aparaturii de înaltă rezoluţie şi a unor truse şi reactivi specifici. Astfel devine posibilă unificarea standardelor de lucru şi o uniformizare în exprimarea rezultatelor analitice. În aceste condiţii aplicarea metodelor statistice poate asigura validitatea şi reproductibilitatea datelor.

De fapt această uzanță - privind "translația metodologică"- este caracteristică și pentru biochimie cu diversele domenii aplicative conexe, e.g.: chimia clinică, chimia alimentară, chimia sanitară a mediului, biotehnologii etc.

BCU IASI/CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

7.RECOMBINAREA GENICA NATURALA

7.1. CONSIDERATII GENERALE

Recombinarea genică este o expresie a modificărilor care apar în genom ca o consecintă a *transferului de gene* cu efecte asupra genotipului şi fenotipului. In condiţii naturale transferul de gene semnifică o circumstanţă în care macromolecule informaţionale (i.e. acizii nucleici) sunt deplasate intra- sau intergenomic.

Transferul de gene se află la baza recombinării genelor, fenomen cunoscut în literatura de specialitate prin denumirea uzuală de "recombinare genetică". Pentru definirea mai riguroasă a proceselor care apar în urma unui transfer de gene convenim a utiliza notiunea de *"recombinare genică"*. Această noţiune, în opinia noastră, exprimă mai realist entităţile biochimice (i.e. "genele") ca formaţiuni participante la transfer.

Recombinarea genică, alături de mutaţia genică reprezintă expresii ale variabilităţii genetice. Fenomenul de variabilitate poate fi decelat atât la nivel de genotip cât şi la nivel de fenotip. În ansamblul său variabilitatea este caracterizată prin două mecanisme distincte: a) mutaţiile şi b) recombinarea genică. Aceasta din urmă va fi prezentată mai detailat în continuare.

Noţiunea de **recombinare** (lat. re-din nou; combinare-a reuni) se utilizează în biologia celulară şi moleculară pentru a defini modificările care apar în genom consecutiv transferului de gene.

In studiul recombinării se are în vedere faptul că modificările genomului se pot produce pe căi naturale (spontan) sau pe căi experimentale (bazate pe procedee biotehnologice). În această accepţie se vor distinge: 1) recombinarea genică naturală şi 2) recombinarea genică mediată biotehnologic.

BCU CLUJ - CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Recombinarea genică naturală se realizează pe căi biochimice naturale (natural biochemical pathways), reprezentând un domeniu specific al biologiei moleculare - în general şi al geneticii moleculare - în special. Problema recombinării genice naturale interesează *eredobiologia*, dar şi *eredopatologia*.

Recombinarea genică experimentală sau artificială se poate realiza prin metode biotehnologice motiv pentru care poate considerată ca o "recombinare mediată biotehnologic". Aceasta este o recombinare indusă prin aplicarea unor procedee specifice tehnicilor elaborate în domeniul biologiei moleculare.

Recombinarea genică mediată biotehnologic se realizează aplicativ pe căi chimice mediate (mediated chemical pathways). Metoda, specifică biotehnologiilor moderne, se bazează pe utilizarea microorganismelor (bacterii, drojdii, micelii etc.) şi a culturilor de celule (vegetale şi/sau animale) pentru producerea de substante de interes biomedical, farmaceutic, alimentar, industrial (e.g. în industriile chimică, petrochimică, extractivă - minereuri şi chiar în energetică).

In cadrul acestor biotehnologii moderne o importanţă deosebită prezintă tehnologia (sau mai exact biotehnologia) DNA recombinant, biotehnologiile enzimatice (pentru produse farmaceutice şi alimentare) ş.a.

Problema recombinării genice se discută atât la organismele acelulare (virusuri) cât şi la organismele celulare (procariote, eucariote).

7.2. RECOMBINAREA GENICA LA VIRUSURI

Recombinarea genică la virusuri (bacteriofagi) a fost studiată şi demonstrată de Delbruck şi Bailez (1946).

La virusuri materialul genetic este reprezentat de un genom constituit din RNA sau DNA. Virusurile cu impact asuprea organismelor uman, animal şi bacterian au însuşirea de-a se replica autonom. Virusurile bacteriilor (i.e.bacteriofagii) au însuşirea de-a se replica autonom producând lizogenia (viruşii temperaţi) sau liza (viruşii virulenţi) la celule-gazda în cadrul "ciclului lizogenic", respectiv a "ciclului litic" (v. Partea I, Cap. 1).

Recombinarea genică la virusuri - ca organisme obligatoriu patogene - se produce în situaţia în care aceiaşi celulă-gazdă este infectată simultan cu doi sau mai mulţi viruşi cu genom diferit.

In patologie circumstanţa este definită ca infecţie mixtă (multiplă). Studiile întreprinse în acest sens pe bacteriofagi au demonstrat că în celula-gazdă este posibilă

multiplicarea simultană a mai multor virusuri cu genom diferit.

Studiindu-se recombinarea genică la ribo - şi deoxiribovirusuri s-a constatat că aceasta determină o mare variabilitate genetică, în cadrul populaţiilor virale. In acest context se poate vorbi de o adaptabilitate crescută a populatiilor virale la condiţiile variabile ale mediului ambiant.

In celula - gazdă, iniţial genomurile virale se află libere. Astfel este posibilă o împerechere (stare cvasidiploidă) la care participă genomuri diferite. In această manieră devine posibil transferul de gene printr-un mecanism de tip crossing over, similar aceluia întâlnit la cromosomi în cursul meiozei. In urma transferului de gene devine posibilă recombinarea genică virală.

Mecanismul de tip crossing over la virusuri - deşi prezintă similitudini cu acela al cromosomilor meiotici - relevă unele diferenţe notabile. Astfel, în celulă procesul afectează cromosomii homologi care se împerechează (sau cu terminologia specifică biologiei celulare "sinaptizează") o singură dată - în profază - realizând astfel transferul de gene.

La virusuri, în cursul infecţiilor multiple, împerecherea genomurilor virale în celula-gazdă se produce de o manieră continuă şi repetată. Procesul începe odată cu infecţia virală când acidul nucleic viral accede în celula-gazdă şi se termină odată cu asamblarea componentelor virale. Se poate conchide astfel că un genom viral poate concura în repetate rânduri la transferul de gene printr-un mecanism de crassing over. Sunt implicate astfel gene de la doi sau trei viruşi cu genom diferit realizându-se în final recombinarea genică virală.

In estimarea recombinării genice se evaluează frecvenţa recombinăriilor care este dependentă de numărul de loci implicaţi şi distanţa dintre aceştia. Evaluarea frecvenţei etapelor de crossing over dintre diverşi loci a creat premizele pentru elaborarea cartării (realizarea hărţilor) genetice la virusuri.

Fenomenul de recombinare genică a fost evidenţiat la virusul polio, virusul gripal, la diverse virusuri bacteriene (bacteriofagi, etc). Recombinarea genică a fost studiată mai detaliat la bacteriofagul T4 al cărui genom include 56 de gene reprezentate printr-o macromoleculă de DNA cu 200.000 deoxiribonucleotide. La nivelul acestora s-au stabilit regiunile susceptibile la recombinarea genică. Spre exemplu, pe o regiune limitată denumită "v" şi formată din 2000 deoxiribonucleotide s- au decelat 308 poziţii mutaţionale la nivelul cărora se poate produce transferul de gene urmat de recombinare (Benzer, 1969).

Aprofundarea cunoştiinţelor despre recombinarea genetică alături de informaţiile despre mutaţia genică au permis producerea de vaccinuri cu viruşi vii atenuaţi, apreciaţi pentru capacitatea ridicată de anticorpogeneză (formare de anticorpi în organism).

7.3. RECOMBINAREA GENICA LA PROCARIOTE

La bacterii există, în general, un singur **genofor** (corespunzător cromosomului de eucariote) care are formă circulară şi este dispus într-un nucleoid lipsit de anvelopa nucleară.

Genoforul, numit adesea pentru simplificare "cromosom bacterian" prezintă o formă circulară. Este format dintr-o singură macromoleculă de DNA dc care conţine cca 10.000.000 deoxiribonucleotide şi are masa de 2-4 · 10^9 Da. Fiind dispus într-un nucleoid (fără anvelopa nucleară) genoforul este totuşi ataşat la o formatiune celulară. Aceasta este denumită *mezosom* şi reprezintă o pliere spre interior a membranei celulare procariotice. Se menţionează faptul că replicaţia genoforului începe în proximitatea mezozomului într-o regiune dispusă aproape de gena H a argininei.

Cu privire la replicaţie se menţionează că la DNA genoforal (termen propus pentru similitudine cu DNA cromosomal, DNA coreal etc) acest proces este autonom. Iniţierea replicaţiei are loc la nivelul unei regiuni scurte, specifice denumită "replicator". Odată începută replicaţia se desfăşoară progresiv pe ambele catene, iar la finea acesteia se formează doi cromosomi circulari.

In afară de DNA genoforal în bacterii se mai află DNA cu rol genetic, care este localizat în interiorul unor formaţiuni citoplasmatice denumite *plasmide* sau *"factori de transfer"* sau (cu o denumire mai veche) *episomi*. Plasmidele conţin, de asemenea, DNA dc circular. Originea acestora nu este pe deplin elucidată. Se estimează că episomii au proveniența endogenă - din genoforul bacterian, rezultaţi în cursul evoluţiei sau o proveniență exogenă şi realizează o simbioză de tip plasmidă-celulă bacteriană.

In celula bacteriană plasmidele se pot afla - în raport cu genoforul- în două stări alternative, care definesc reproducerea acestora:

- stare autonomă - în care plasmidele se reproduc independent de genoforul bacterian;
- stare integrată - în care plasmidele se reproduc sincron cu genoforul bacterian, situaţie în care celula bacteriană manifestă o înaltă frecvenţă de recombinare - notată uzual prin Hfr (engl. high frequency of recombination).

Activitatea biologică a plasmidelor este explicată, indirect, de structura chimică a acestora. Astfel, s-a constatat că "plasmidele" sunt "factori de transfer" cu conţinut de DNA, care trec dintr-o celulă în alta în timpul conjugării. Transferul se poate face în două maniere:

- independent de genofor (deci de DNA genoforal) - situaţie în care între celulele bacteriene se deplasează univoc "factori de transfer", e.g.: factorul de fertilitate (F),

factorul de transfer al rezistenței, factorul colinergic etc. Transferul independent este posibil pentru considerentul că plasmidele se pot afla în "starea autonomă" când poate avea loc replicația independent de genofor;

- integrat în genofor - situație în care se produce transferul de gene de la o celulă bacteriană la alta.

Aceste particularități ale transferului de DNA la procariote (studiat îndeosebi la bacterii) explicitează particularitățile recombinării genice la aceste organisme.

La bacterii genomul are o constituție mai complexă. In cazul acestora recombinarea genică se realizează prin mecanisme specifice, în cadrul proceselor de: 1) transformare; 2) conjugare; 3) sexducție; 4) transducție. In continuare se vor descrie sumar aceste procese.

7.3.1. TRANSFORMAREA

Transformarea este un proces de recombinare genică la originea căruia se află transferul unui fragment din macromolecula de DNA (care include una sau chiar două-trei gene). Transferul fragmentului de DNA macromolecular - reprezentând în fapt un segment din genoforul ("cromosomul") bacterian - se realizează de la genomul unei *bacterii donoare* la genomul unei *bacterii receptoare*.

Transferul de gene rezidă în trecerea de la genomul donor al unui fragment de "DNA exogen" - considerat **"DNA-transformator"**, care se sinaptizează ("se leagă") la un segment de "DNA omolog" al genomului receptor. Integrarea se realizează printr-un proces de crossing-over.

Fenomenul de transformare a fost observat la bacteriile din specia Diplococcus pneumoniae (Griffith, 1928). Această bacterie - numită uzual pneumococ - este patogenă, produce pneumonia. Dacă se ia o suşă de la această specie şi se procedează la distrugerea termică a bacteriilor, apoi din suspensia rezultată se adaugă unei alte suşe de pneumococi vii nepatogeni se remarcă apariția patogenității. Apariția patogenității la descendenții din suşa nepatogenă produsă de suspensia provenită de la suşa patogenă (dezactivată termic) a relevat existența unui "principiu transformator".

Ulterior prin cercetările efectuate de Avery et al. (1944) s-a constatat că în cauză este "DNA transformator". Acest DNA provenit de la un genom donor, trece şi interacționează cu DNA din genomul receptorului, printr-un proces de recombinare genică (care rezidă în înlocuirea unor secvențe de deoxiribonucleotide). Urmarea acestei recombinări este apariția patogenității.

Din studiile menţionate mai sus s-a putut concluziona că materialul genetic din bacteriile patogene distruse prin căldură nu suferă modificări, deci DNA bacterian rămâne nealterat. Acesta poate străbate peretele celular al bacteriilor nepatogene (evident doar la o parte din bacterii) şi intră în interacţie cu DNA al acestora. Astfel din *DNA transformator* al donorului şi DNA omolog al receptorului se formează, în urma unui proces de crossing-over, o moleculă de **DNA recombinat**. Acesta are capacitate infectantă. Astfel se poate conchide că prin "transformare" - la baza căreia se află recombinarea genică - se realizează un transfer de informaţie biologică.

Procesul de transformare studiat pe tulpini bacteriene de Diplococcus pneumoniae (pneumococi), a permis constatarea faptului că tulpinile de pneumococi nepatogene pot fi transformate în tulpini patogene. Astfel de studii s-au efectuat pe tulpini cultivate în mediu de agar, observându-se că tulpinile nepatogene formează colonii cu celule rugoase (R), iar tulpinile patogene formează colonii cu celule netede (S).

Injectarea la animale de laborator - şoareci a unor suspensii obţinute din diverse colonii de celule (fig.7-1) produc efecte diferite. Astfel, injectarea şoarecilor cu o suspensie din colonii cu celule vii de tipul Rv nu este daunătoare - animalele rămân în viaţă (fig.7-1 a), pe când injectarea unei suspensii din colonii cu celule vii de tipul Sv este letală pentru şoareci (fig. 7-1 b). In cazul utilizării unei suspensii cu celule de tip Si (deci provenită de la colonii cu tulpini patogene) - după o prealabilă inactivare (distrugere) termică a celulelor, injectarea şoarecilor nu produce letalitate (fig. 7-1 c). In fine, în situaţia în care se utilizează un amestec de suspensii conţinând atât celule de tip Si (după inactivarea termică) cât şi celule vii de tipul Rv se observă din nou letalitatea (fig. 7-1 d). Aceste patru situaţii diferite (v. fig. 7-1) pot explicita transformarea tulpinilor nepatogene de pneumococi în tulpini patogene.

Din datele prezentate se poate conchide că celulele vii de tip Rv au fost supuse unui "proces transformator" de către celulele inactivate (distruse) termic de tip Si. In urma acestui proces de transformare se formează celule patogene de tip Sv. Din aceste observatii s-a concluzionat că în celulele Si inactivate (distruse) termic a mai rămas un **"principiu stabil termic"**. Acest "principiu" a fost denumit "principiu transformator" şi a fost identificat a fi molecula de DNA. Confirmarea s-a făcut prin izolarea DNA din celulele Si (inactivate termic), obţinându-se DNA înalt purificat. Acesta este- in facto- **"principiul transformator"** care in vitro, în raport cu celulele de tip Rv reactivează patogenitatea (Avery et al., 1944).

Se poate conchide că experimentul descris a condus la concluzia că DNA este purtătorul informaţiei genetice (informaţia genică) legată de patogenitate. Iniţial au fost şi

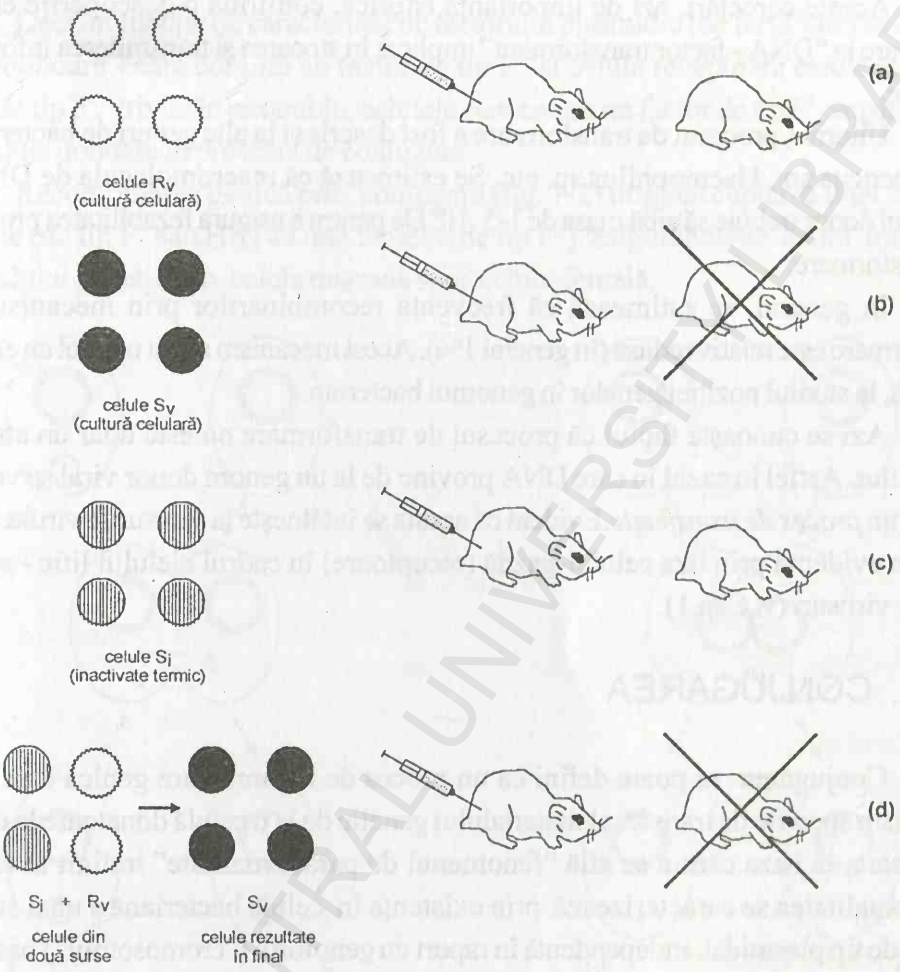


Fig. 7-1. Rolul moleculei de DNA în procesul de transformare a tulpinii de Diplococcus pneumoniae (explicații în text)

unele opinii contradictorii care au pledat pentru ipoteza existenței unui "factor mutagen", care ar putea induce transformarea celulelor Rv în celule Sv. Cercetările care au urmat au infirmat această ipoteză și au condus la concluzia că: DNA transformant din celulele de tip Si se integrează în DNA din celulele-gazdă de tip Rv, replicația producându-se concomitent. Astfel celullele de tip Rv în suspensie comună cu celule de tip Si (inactivate termic) - dar cu conținut de DNA biologic activ - pot să se transforme în celule de tip Sv, care sunt patologic active.

BCU "LUCIAN BLAGA" CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Aceste cercetări, azi de importanţă istorică, confirmă o descoperire crucială referitoare la "DNA - factor transformant" implicat în stocarea şi transmiterea informaţiei genetice.

Ulterior, procesul de transformare a fost descris şi la alte genuri de bacterii, e.g.: Streptococus sp., Haemophilus sp. etc. Se estimează că macromolecula de DNA din genomul donor trebuie să aibă masa de 1-5 .10^6 Da pentru a asigura fezabilitatea procesului de transformare.

In general, se estimează că frecvenţa recombinărilor prin mecanismul de transformare este relativ redusă (în general 1%). Acest mecanism a fost utilizat cu eficienţă limitată, la studiul poziţiei genelor în genomul bacterian.

Azi se cunoaşte faptul că procesul de transformare nu este doar un atribut al bacteriilor. Astfel în cazul în care DNA provine de la un genom donor viral se vorbeşte despre un *proces de transfecţie*.Evident că acesta se întâlneşte la virusurile virulente şi se pune în evidenţă prin liza celulei-gazdă (receptoare) în cadrul ciclului litic - specific acestor virusuri (v. Cap.1).

7.3.2. CONJUGAREA

Conjugarea se poate defini ca un proces de recombinare genică care are un mecanism specific de transfer al materialului genetic de la o celulă donatoare la o celulă receptoare, la baza căruia se află "fenomenul de parasexualitate" întîlnit la bacterii. Parasexualitatea se caracterizează prin existenţa în celula bacteriană a unei structuri genice de tip plasmidal, independentă în raport cu genoforul ("cromosomul") bacterian.

Plasmida denumită şi *"factor plasmidic"* sau *"factor de fertilitate"* - notat prin F, sau (denumită în tratatele mai vechi "episom"), conferă celulei bacteriene o anumită "tipologie". această tipologie este, de fapt, dictată de caracteristicile DNA plasmidal.

Recombinarea genică prin conjugare, întâlnită la bacterii, a fost demonstrată prin cercetări ştiinţifice efectuate pe Escherichia coli la tulpina K12 (Lederberg şi Tatum, 1946).

Prin investigaţii experimentale au fost decelate bacterii de tip mascul care pot prezenta în unele cazuri un factor de fertilitate de *tipul* F^+, independent de genoforul bacterian, sau, în alte cazuri, un factor de fertilitate de *tipul Hfr* (high frequency of recombination) - integrat genoforului bacterian.

De asemenea, au fost decelate celule bacteriene de tip femel caracterizate prin absenţa factorului de fertilitate propriu, i.e. *tipul* F^-.

Deci, în funcţie de caracteristicile factorului plasmidic (de fertilitate) se disting: celula donoare - care conţine un factor de tip F^+ şi celula receptoare care conţine un factor de tip F^-. Privite în ansamblu, celulele care conţin un factor de tip F^+ sau de tip Hfr sunt celule donoare în procesul de conjugare.

Recombinarea genică prin conjugare (fig. 7-2) implică cuplarea unei bacterii mascule (de tip F^+ sau Hfr) cu una femelă (de tip F^-), asigurându-se astfel transferul materialului genetic din celula masculă spre celula femelă.

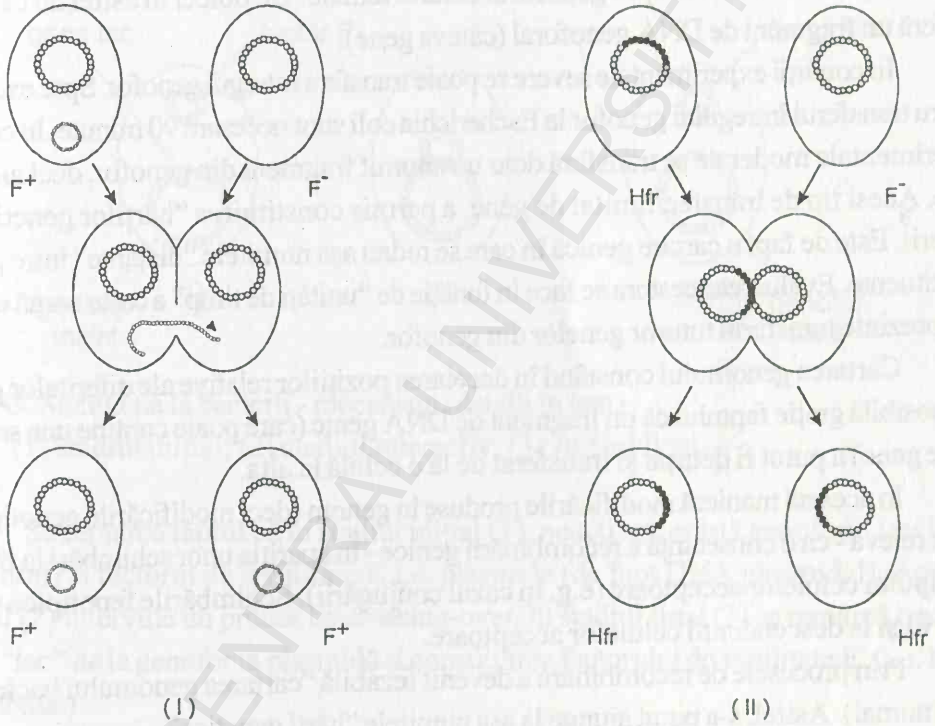


Fig. 7-2. Conjugarea la bacterii - mecanisme posibile (detalii în text)
(I) conjugarea indusă de celule donoare cu factor de tip F^+
(II) conjugarea indusă de celule donoare cu factor de tip Hfr

In cazul conjugării celulelor mascule cu factor de fertilitate (de tip F^+) cu celule femele lipsite de factor de fertilitate (de tip F^-) se produce un transfer al factorului de fertilitate (în plasmidă). Astfel, în final, după o sinaptizare ("legare") a celulelor are loc transferul în plasmidă (i.e. DNA plasmidal). După conjugare ambele celule devin de tip mascul.

BCU CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

In cadrul recombinării genice prin "conjugare sexuală" transferul materialului genetic, i.e. a DNA genoforal de la o bacterie la alta, deci de la o celulă "masculă" (F^+) la o celulă "femelă" (F^-) se face printr-un pil sau o fimbrie. Aceste formaţiuni membranare funcţionează ca şi canale de joncţiune intercelulare.

Dacă are loc conjugarea unei celule mascule cu factor de fertilitate de tipul Hfr (high frequency of recombination) - integrat genoforului cu o celulă femelă (de tip F^-) are loc un transfer de gene. Acest transfer se face printr-un proces de crossing-over de la genoforul celulei mascule spre genoforul celulei femele. De obicei în astfel de cazuri se trasferă un fragment de DNA genoforal (câteva gene).

In condiţii experimentale severe se poate transfera întregul genofor. Spre exemplu, pentru transferul întregului genofor la Escherichia coli sunt necesare 90 minute. In condiţii experimentale moderate se transferă doar un anumit fragment din genofor, deci anumite gene. Acest tip de transfer. limitat de gene, a permis constituirea "hărţilor genetice" la bacterii. Este de fapt o cartare genică în care se redau aşa numitele "distante" între genele constituente. Evaluarea acestora se face în funcţie de "unităţi de timp" a caror sumă trebuie să reprezinte transferul tuturor genelor din genofor.

Cartarea genomului constând în decelarea poziţiilor relative ale diferitelor gene a fost posibilă graţie faptului că un fragment de DNA genic (care poate conţine una sau mai multe gene) a putut fi detaşat şi transferat de la o celulă la alta.

In această manieră modificările produse în genom (deci modificările genotipului) se pot releva - ca o consecinţă a recombinării genice - în apariţia unor schimbări la nivelul fenotipului celulelor acceptoare (e.g. în cazul conjugării). Schimbările fenotipice se pot observa şi la descendenţii celulelor acceptoare.

Prin procesele de recombinare a devenit fezabilă "cartarea genomului bacterian" (şi nu numai). Astfel, s-a putut ajunge la aşa numitele "hărţi genetice".

In acest context se menţionează faptul că prin "experimente de conjugare" efectuate pe E.coli suşa K12, a fost posibilă stabilirea "hărtii genetice" la cromosomul ("genoforul" în sensul terminologiei utilizate în acest volum") acestei bacterii. Genomul este format dintr-un DNA circular închis la care conjugarea are o ciclitate de 90 minute (Taylor şi Troter, 1967).

7.3.3. SEXDUCTIA

Sexducţia reprezintă un proces de recombinare genică bazat pe un mecanism de includere a unei gene din genoforul ("cromosomul") bacterian în factorul de fertilitate F,

i.e. plasmida (mai exact DNA plasmidal).

In acest mod se formează factorul de fertilitate recombinat (F`). La originea procesului se află moleculele de DNA din genofor şi din plasmidă.

Transferul de gene în astfel de cazuri se limitează de obicei la o genă. Aceasta trece din genofor în factorul de fertilitate printr-un proces de crossing-over.

Un astfel de exemplu - curent uzitat pentru explicitarea sexducţiei - este transferul genei "lac" (gena care permite metabolizarea lactozei) de la genofor spre factorul de fertilitate F' (fig. 7-3).

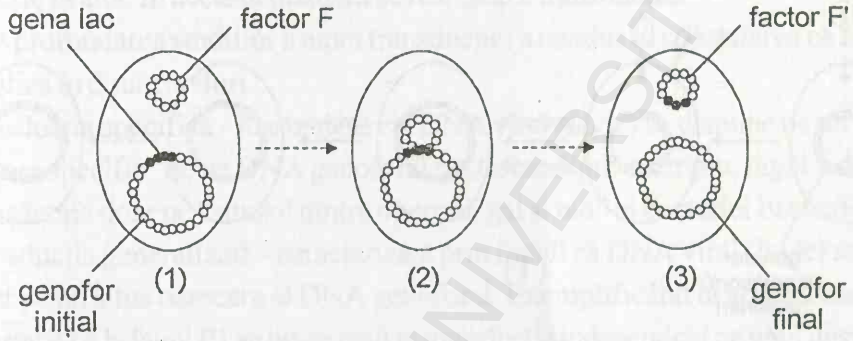


Fig. 7-3. Sexducţia la bacterii - mecanism (detalii în text)
(1) stadiul iniţial; (2) stadiul interactiv; (3) stadiul final

Se remarcă faptul că în stadiul iniţial (1), neactivat, există genoforul (cu DNA genoforal) şi factorul de fertilitate F, i.e. plasmida (de fapt DNA plasmidal). Apoi, în stadiul (2) intervine un proces de crossing-over. In stadiul final (3) se remarcă trecerea genei "lac" de la genofor la plasmidă şi constituirea factorului de fertilitate F' (i.e. DNA recombinat).

7.3.4. TRANSDUCTIA

Transducţia constituie un proces de recombinare genică în care mecanismul de transfer al materialului genetic, de la o bacterie la altă bacterie, implică prezenţa anumitor virusuri (i.e. fagii temperaţi).

Procesul de recombinare genică prin transducţie a fost descoperit la bacteriile din specia Salmonella Typhimurium la care s-a constatat că transferul de material genetic (i.e. fragmente de DNA) se poate realiza prin intermediul "virusurilor transductoare" (Zinder şi Lederberg, 1952).

În principiu, transducţia se poate produce la toate speciile bacteriene, dar este condiţionată strict de prezenţa virusurilor (fagilor) cu proprietatea de transductor. Această proprietate se întâlneşte la viruşii temperaţi şi lipseşte la viruşii virulenţi.

Fagii temperaţi sunt virusuri bacteriene cu un genom care se poate integra în genomul bacterian. In această situaţie este posibilă replicaţia sincronă - în generaţii succesive de bacterii - caracteristică a ciclului lizogen (fig.7-4).

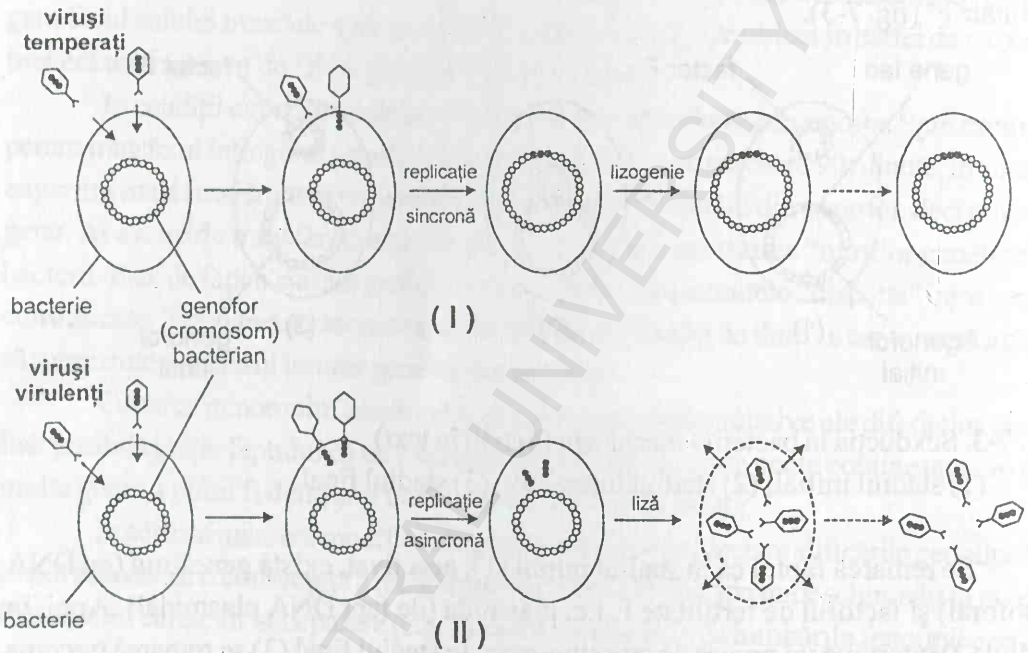


Fig. 7-4. Faze interactive specifice transducţiei în relaţia virus-bacterie
(I) acţiunea viruşilor temperaţi; (II) acţiunea viruşilor virulenţi

Prin integrarea fagului temperat în genoforul ("cromosomul") bacterian se formează profagul. La finele ciclului lizogen în bacterii există profagi.

Unele virusuri bacteriene din grupa fagilor temperaţi (asemănător plasmidelor) pot integra, în anumite condiţii, fragmente din genoforul ("cromosomul") bacterian. Fragmentele integrabile sunt de fapt gene bacteriene, deci DNA genoforal. Din aceste considerente s-a introdus noţiunea de **vectori** ai genelor, pentru a desemna *bacteriofagii* (virusurile bacteriene) şi *plasmidele* care preiau şi transferă DNA din gene. Astfel de vectori stau la baza fenomenului de recombinare genică prin transducţie.

Pot exista însă şi situaţii în care materialul genetic al bacteriofagilor se detaşează de genoforul bacterian replicându-se independent. In astfel de cazuri se poate produce replicaţia asincronă caracteristică ciclului litic (v.fig.7-4). Aceasta este urmată de liza celulei-gazdă.

Se face remarca faptului că în cursul separării materialului genetic al bacteriofagilor i.e. acizi nucleici virali (DNA sau RNA coreal) de genofor (DNA genoforal), este posibilă preluarea uneia sau mai multor gene bacteriene. In etapa viitoare prin infectarea altei celule bacteriene de către profag, devine posibil transferul de gene de la o bacterie la alta. In această manieră se realizează transducţia.

Aprofundarea studiilor asupra transducţiei a condus la constatarea că aceasta se poate realiza în două moduri.

a) transducţia specifică - în cazul căreia DNA viral (fagic) se dispune pe un "situs de ataşare specific" de pe DNA genoforal bacterian. Spre exemplu, fagul λ determină transducţia doar pe "situsul dintre operonii gal şi bio" ai bacteriei Escherichia coli.
b) transducţia generalizată - caracterizată prin faptul că DNA viral (fagic) se dispune liber pe un situs oarecare al DNA genoforal. Exemplificând la aceeaşi bacterie s-a constatat că la fagul P1 se poate realiza transducţia independent pe unul din situsurile existente la bacteria Escherichia coli.

Remarcabil este faptul că există o anumită similitudine între mecanismul de acţiune al profagilor - care sunt formaţiuni virale - şi plasmidelor - care sunt structuri bacteriene. In ambele cazuri este posibilă integrarea sau non-integrarea în genoroful bacteriei.

Prin recombinarea genică pe calea transducţiei fagii intervin în realizarea variabilităţii genetice la bacterii şi în adaptarea acestora la mediu.

Un astfel de exemplu - cu implicaţii biomedicale - de interes atât pentru medicina umană cât şi pentru medicina veterinară, este ilustrat de producerea "factorului de rezistenţă la antibiotice" notat uneori F_R sau factor R . Astfel de observaţii s-au efectuat pe diverse tulpini bacteriene.

Cu referire la transferul de material genetic de la o bacterie la altă bacterie, s-a remarcat faptul că poate fi realizat de către viruşi care acţionează ca şi *"transductori"*, dar şi de viruşi acre acţionează ca şi *"convertizori"*. Transferul realizat de viruşii convertizori este considerat un caz particular al *"transducţiei"* şi este cunoscut sub numele de *"conversie"*.

Prin conversie se realizează, ca şi în cazul general, un proces de recombinare genică, însă cu precizarea că transferul de material genetic vizează transportul unor gene care determină producerea de toxine. Astfel, celulele bacteriene, în care s-au transportat astfel de gene, devin surse pentru toxicogeneză. În urma acţiunii unor virusuri convertizoare, apar tulpini bacteriene toxicogene e.g.: tulpina de Staphilococus Aureus produce enterotoxina stafilococică A, etc. Aceste efecte sunt explicitate de faptul că virusul convertizor a transportat gene care au codificat biosinteza de toxine.

7.4. RECOMBINAREA GENICA LA EUCARIOTE

Eucariotele ca organisme multicelulare au un genotip mai complex. Informaţia biologică (genetică) se află în **cromosomii** prezenţi în nucleul celular.

Cromosomii (gr.chroma-culoare; soma-corp), prezintă câteva caracteristici distinctive, între acestea menţionându-se: a)numărul constant - acesta fiind un atribut al fiecărei specii; b)conservarea identităţii în cursul diviziunii celulare mitotice; c) capacitatea de redistribuire egalitară în cursul diviziunii celulare meiotice; d)proprietatea de "cantonare" a genelor şi menţinere a unui anumit "status genic". Noţiunea de "status genic" s-a conturat mai clar odată cu progresele realizate în studiul genomului uman.

Pornind de la caracteristicile cromosomilor se poate stabili **cariotipul** fiecărei specii. Noţiunea de cariotip (gr.karion-nucleu) defineşte numărul, forma şi mărimea cromosomilor dintr-un set diploid (2n). Cariotipul prezintă interes pentru biologia celulară şi a stat la baza sistematizării informaţiilor privind morfologia cromosomală. Studiul detailat al cromosomilor şi al genelor constituente - de fapt a DNA cromosomal - a făcut obiectul de studiu al biologiei moleculare. In acest sens au fost dezvoltate cercetările cu deosebire la genomul uman şi s-au creat adevărate "bănci de date" cu referire la cromosomi şi gene (v.Cap.11).

Referitor la genomul uman - pentru a avea o imagine de ansamblu - se prezintă date generale în tabelul 7-1.

Cu referire la recombinarea genică naturală la eucariote studiul acesteia a întâmpinat numeroase dificultăţi datorită complexităţii structurale a DNA din gene. S-a arătat deja că deoxiribomononucleozidfosfatii (dNMP) din DNA al genelor formează secvenţe **reiterative** (repetitive sau redundante) şi secvenţe **unice.**

Se estimează că secventele de DNA reiterative intervin în procesele de reglare a genelor, iar secvenţele de DNA unice reprezintă gene structurale. Particularităţile relaţiei structura chimică-activitate biologică la DNA din gene şi problema dispunerii genelor în cromosomi a fost studiată prin procedee specifice biologiei moleculare, servind pentru cartarea genomului.

Recombinarea genică naturală la eucariote a fost studiată îndeosebi la drojdii şi la fungi, pentru considerentul că experimente de laborator erau mai facile la aceste eucariote.

Un important studiu privind recombinarea la eucariote a fost întreprins de Holliday 1964) asupra fungilor. In cadrul acestui studiu s-au elaborat "modele de recombinare" bazate pe premisa că fiecare cromatidă este formată dintr-un dublu helix de DNA care se modifică în cursul ciclului celular (v.Partea I). Astfel, pe de o parte există posibilitatea de

Tabel 7-1. Date generale privind genomul uman - tipurile cromosomilor, dimensiunile şi conţinutul DNA cromosomal

Cromosomi umani		Dimensiuni (kb)	Cuantumul DNA în raport cu genomul haploid (%)
Tip	Denumire		
Autosomi	1	250000	8,00
	2	243000	8,00
	3	202000	6,50
	4	193000	6,20
	5	184000	5,90
	6	173000	5,60
	7	160000	5,20
	8	146000	4,70
	9	137000	4,40
	10	136000	4,40
	11	137000	4,40
	12	134000	4,30
	13	110000	3,33
	14	103000	3,30
	15	100000	3,20
	16	73000	3,00
	17	85000	2,70
	18	81000	2,60
	19	62000	2,00
	20	67000	2,10
	21	48000	1,50
	22	52000	1,60
Gonosomi	X	154000	5,00
	Y	53000	1,70

recunoaştere a regiunilor homoloage şi o dispunere coerentă a acestora, prin sinaptizare, în cazul cromosomilor homologi. Pe de altă parte există posibilitatea "ruperii" diverselor regiuni cromosomale - condiţionat (în opinia autorului) de fenomene de polaritate - urmată de "reunirea" diferită. In astfel de situaţii se realizează recombinarea. Se opinează că în aceste cazuri există şi o deplasare a chiasmei spre capetele cromosomului pentru a facilita recombinarea.

Cu referire la recombinarea naturală la eucariote studiul acesteia în genetica celulară şi moleculară clasică s-a dovedit dificilă. Cu toate acestea efectele recombinării genetice (genice) sunt unanim recunoscute.

Recombinarea genică este considerată ca unul din factorii majori care stă la baza variabilității şi a asigurat, în timp, formarea populațiilor naturale.

O interesantă opinie ne oferă literatura de specialitate, prin propunerea de acreditare a ideii că în intestinul mamiferelor ar putea fi posibile procese de recombinare între DNA din celule umane şi DNA bacterian. In această accepție se poate considera că recombinarea genică naturală a devansat recombinarea genică mediată biotehnologic. Afirmația are în vedere faptul că exemplul mai sus citat supozează posibilitatea formării DNA recombinant in vivo, prin recombinare interspecifică (celule umane-celule bacteriene).

In fine, cu referire la diversitatea fragmentelor de DNA din gene, ca expresie a recombinării, sau acțiunii unor agenți mutageni, problema a putut fi abordată cu acurateţe prin mijloacele geneticii inverse, mijloce puse la dispoziție de progresele realizate în biologia moleculară (v.Partea I, Cap.4). Astfel de date, importante pentru eredobiologie, genetică, patologia biochimică, apar tot mai des în periodicele de specialitate odată cu progresele realizate în cartarea genomului uman.

BCU IASI/CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

8. RECOMBINAREA GENICĂ MEDIATĂ BIOTEHNOLOGIC

8.1. CONSIDERAȚII GENERALE

Recombinarea genică întâlnită în natură sau realizată în laborator prin metode specifice biotehnologiei (i.e. "mediată" biotehnologic), prezintă interes pentru cercetările fundamentale și pentru caracterul aplicativ cu orientare spre bioindustrii.

Atât în domeniul fundamental cât și aplicativ se utilizează descoperirile științifice privitoare la ingineria genetică.

Ingineria genetică - definită ca un ansamblu de metode și tehnici de manipulare a informației genetice la nivel molecular și celular, se pretează pentru obținerea de genotipuri noi, i.e. organisme "reprogramate genetic", importante pentru lucrările de ameliorare (la plante și animale), pentru bioindustrii, pentru investigațiile biomedicale etc.

Recombinarea genică mediată biotehnologic apelează la procedee industriale bazate pe procese biologice. In vederea soluționării acestor deziderate se obțin culturi de microorganisme (bacterii, drojdii etc.) și culturi de celule vegetale și animale, folosindu-se *bioreactoare automatizate* care mențin constanți parametrii de lucru. In acest sens s-au perfectat tehnici de cultură a celulelor în *flux continuu*.

Acestea necesită o continuă primenire a mediului de cultură și preluare a produselor rezultate. In culturile de celule (vegetale sau animale) este posibilă obținerea de organisme haploide, multiplicarea rapidă a genotipurilor utile prin procedee de clonare, formarea de linii celulare de tip izogen ș.a.m.d.

Implementarea biologiei moleculare în general și a tehnologiei DNA recombinant în special, în biotehnologiile moderne a permis o dezvoltare impresionantă a acestora în ultimele două decenii.

BCU IASI - CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Noţiunea de "DNA recombinant" include, la modul general, un sumum de tehnologii specifice acizilor nucleici, tehnologii care s-au dezvoltat după anii '70. In mod specific, termenul de **"tehnologia DNA recombinant"** se referă la tehnicile utilizate pentru manipularea, transportul, recombinarea şi propagarea DNA (Freifelder, 1987, Sittman, 1994; Gârban, 1996).

Cu ajutorul metodelor biotehnologice s-au obţinut rezultate importante sub raport: **biomedical**, e.g.: vaccinuri, interferoni; **farmaceutic**, e.g.: hormoni, antibiotice, vitamine, aminoacizi; **alimentar**, e.g.: aminoacizi, proteine alimentare, enzime, (necesare în fermentaţie pentru băuturi, brânzeturi etc.); **agricol**, e.g.: organisme "reprogramate genetic" pentru ameliorare (plante, animale), proteine furajere; **industrial** în industria chimică (e.g.: acetonă, metanol, etanol, solvenţi) şi în energetică (e.g.: biogaz, alcooli inferiori).

Din numeroasele aplicaţii în acest volum se vor releva unele aplicaţii de interes biomedical, farmaceutic, alimentar etc.

In continuare se vor discuta mijloacele operatoare pentru tehnologia DNA recombinant şi aspecte aplicative privind strategia obţinerii acestuia.

8.2. MIJLOACE OPERATOARE PENTRU DNA RECOMBINANT

In centrul problematicii DNA recombinant se află utilizarea **enzimelor specifice** care acţionează asupra acizilor nucleici. Aceste enzime pot fi considerate ca **"mijloace operatoare" pentru tehnologia DNA recombinant** (definite în literatura de specialitate ca "tools of recombinant DNA"). Aceste "mijloace" sau "instrumente" permit manipularea DNA şi RNA, iar cunoaşterea mecanismelor de acţiune reprezintă problema esenţială a utilizării acestora.

In acest cadru se vor prezenta, succint, unele date referitoare la trei categorii de enzime specifice: 1) enzime de restricţie şi modificaţie; 2) enzime din grupa DNA polimerazelor; 3) enzime din grupa DNA ligazelor.

8.2.1. ENZIME DE RESTRICŢIE ŞI MODIFICAŢIE

Primele cercetări asupra *enzimelor de restricţie şi modificaţie*, respectiv a *sistemelor de restricţie şi modificaţie*, i.e. "sistemele R-M" la celulele bacteriene au fost efectuate de Luria şi Human (1952), apoi de Bertani şi Weigle (1953). Aceste cercetări au evidenţiat la bacteriofagi discrepanţa capacităţii de infectare condiţionat de tulpina bacteriană.

Problema bazelor moleculare ale diferenței de capacitate infectantă a bacteriofagilor s-a aprofundat în deceniile următoare. In acest sens se menționează că au fost efectuate studii asupra a trei tulpini ale bacteriei E. coli notate prin K12, B şi C, urmărindu-se evoluția infecției cu bacteriofagul lambda. Particulele de bacteriofagi (virioni) formați - notați prin λ-K, λ-B, λ-C - au constituit criterii de evaluare a capacității de infectare.

O observație importantă a fost aceea că formarea particulelor de bacteriofagi i.e. a virionilor este mai limitată, mai restrânsă (sau cu un termen generic "restrictată") în cazul schimbării tulpinii la bacteria gazdă.

Trecerea (pasajul) unor bacteriofagi prin anumite tulpini bacteriene poate fi grevat de fenomene de modificație (la cca. 1‰ din bacteriofagi), care deblochează mecanismele de restricție.

În literatura de specialitate din limba română se folosesc termenii de "restricție-modificare" (Popa şi Repanovici, 1982) şi "restricție-modificație" (Maximilian şi Ioan, 1984). Ultima variantă pare mai adecvată sub raport etimologic şi mai apropiată terminologiei din alte limbi, fiind preferabilă din acest considerent.

Sistemele de restricție-modificație (R-M) constituie un apanaj al numeroaselor bacterii. Aceste sisteme funcționează ca mijloace de apărare împotriva infecțiilor cu bacteriofagi şi - aşa cum relevă denumirea - sunt formate din două componente:

1) **Sistemul de restricție** - este caracteristic bacteriilor producătoare de enzime care limitează capacitatea infectantă a virusurilor bacteriene (bacteriofagilor). Enzimele respective sunt endonucleaze foarte specifice care asimilează bacteriofagul (i.e. DNA bacteriofagal).Enzimele care intervin în această interacție sunt numite curent *enzime de restricție*.
2) **Sistemul de modificație** - este prezent la bacterii şi asigură producerea de enzime care modifică propriul DNA pentru a fi protejat împotriva asimilării de către propriile enzime de restricție. Funcționarea sistemului de modificație este asigurată de metilarea unor secvențe nucleotidice specifice din DNA bacteriofagal. În acest sens intervin enzimele numite *metilaze*. Secvențele metilate nu mai pot fi recunoscute şi deci rămân "nesecționate" de enzimele de restricție.

In privința sistemelor R-M se menționează existența a **trei tipuri de sisteme** diferite prin caracteristicile enzimelor elaborate şi a mecanismului de acțiune a acestora:

I) sistemul R-M de tip I - include enzime care pot acționa doar în prezența unor co-factori (i.e.: S-adenozilmetionina: SAM şi acidul adenozin- trifosforic: ATP).

Enzimele acestui sistem permit recunoaşterea anumitor secvențe nucleotidice, dar nu activitatea strictă pe un anumit situs - specific neasigurând rigoare fragmentării dc-DNA.

Se consideră că în cazul enzimelor din sistemul R-S de tipul I "restricţia" şi "modificaţia" nu se realizează pe acelaşi situs molecular.

II) sistemul R-M de tip II - este reprezentat de grupe de enzime care acţionează în absenţa de co-factori (SAM, ATP) şi asigură incizia moleculară DNA dc în interiorul secvenţelor nucleotidice.

Enzimele caracteristice pentru acest sistem se pot include în trei subtipuri: tetra-, penta- şi hexanucleotidic. Aceste subtipuri evidenţiază de fapt numărul de nucleotide din situsul-specific, i.e. secvenţa nucleotidică de recunoaştere. In funcţie de numărul de perechi de nucleotide din situs 4, 5 sau 6 se pot calcula perechile de baze dintr-un fragment de DNA rezultat prin acţiunea enzimelor, e.g.:

- subtipul tetranucleotidic $4^4 = 256$ pb / fragment DNA
- subtipul pentanucleotidic $4^5 = 1024$ pb / fragment DNA
- subtipul hexanucleotidic $4^6 = 4096$ pb / fragment DNA

Se menţionează faptul că enzimele din sistemul R-S de tipul II au funcţii de "restricţie" şi nu au funcţii de "modificaţie". asupra enzimelor de restricţie din sistemul R-M de tip II se va reveni cu detalieri.III) sistemul R-M de tip III - se limitează doar la acele enzime a căror activitate poate fi stimulată de SAM fără a fi absolut necesară prezenţa acestuia. Acest sistem este mai puţin răspândit.

Enzimele care aparţin acestui sisitem, prin clivaj molecular pot forma fragmente de DNA fără a exista un situs-specific. Această observaţie este confirmată de faptul că fragmentele de DNA obţinute nu pot fi utilizate la "construcţia" altor molecule, pretându-se doar la reconstituirea DNA original.

Din pleiada enzimelor produse de sistemele R-M mai sus menţionate, *doar enzimele sistemului R-M tip II* se pretează utilizării curente ca mijloace operatoare în **tehnologia DNA recombinant**.

Enzimele de restricţie de tip II, numite şi endonucleaze de restricţie de tip II, recunosc secvenţele specifice din dc-DNA şi efectuează două "incizii secvent-specifice", una la fiecare catenă a moleculei. Aceste "incizii" numite şi secţionări moleculare sau "clivări moleculare" dau naştere extremităţilor 3`-hidroxil (3'-OH), respectiv 5`-fosfat (5'-H_3PO_3).

Pentru nominalizarea efectului enzimelor de restricţie asupra catenelor de DNA se utilizează în mod curent diverşi termeni, e.g.: "clivare", "secţionare", "tăiere", "incizie", "fragmentare". Aceşti termeni au semnificaţii lexicale diferite. În Biologia moleculară, termenii menţionaţi mai sus au aceeaşi semnificaţie indicând ruperea catenelor de DNA. Convenim a acredita, în acest volum, utilizarea predilectă a termenilor de *"clivare*

moleculară" sau *"incizie moleculară"* pentru o prezentare mai coerentă a textului.

Locurile sau situsurile de recunoaştere ale enzimelor de restricţie sunt scurte. Acestea includ -de obicei- patru, cinci sau şase perechi de nucleobaze. Se consideră că *situsurile de recunoaştere* de către enzimă se realizează într-un mod caracteristic, relevând existenţa unei specificităţi enzimatice.

In sistemele de restricţie - modificaţie rolul esenţial revine enzimelor care controlează "clivarea" moleculară a dc-DNA sau protejarea acesteia (Arber şi Dussoix, 1962; Arber, 1977; Popa şi Repanovici, 1982; Zarnea, 1986; Kaplan şi Delpech, 1990; Bailey şi Ollis, 1997).

8.2.1.1. Enzime de restricţie

Enzimele de restricţie (lat.restrictio-restricţie) - au proprietatea de-a produce incizia moleculară ("secţionarea", "cuparea" sau "clivarea moleculară") a DNA duplex, i.e. dc-DNA în fragmente specifice. Izolarea enzimelor de restricţie s-a făcut din bacterii. Astfel de enzime sunt endonucleazele, numite *"endonucleaze de restricţie"*.

Se impune menţionarea faptului că enzimele de restricţie sunt endonucleaze de origine bacteriană care pot cliva moleculele de dc-DNA străine de bacterie, e.g.: moleculele de DNA care acced în celula bacteriană. Aceste enzime nu produc clivarea DNA bacterian propriu pentru considerentul că acesta are "situsuri specifice" în care există nucleobaze metilate. Aceste "situsuri specifice" sunt, de fapt, "semne" de recunoaştere care permit protejarea DNA bacterian propriu.

Endonucleazele pot produce incizia moleculară (clivajul molecular) în ambele catene ale duplexului: în *proximitatea axei de simetrie* (e.g.: enzimele Eco R I sau Eco R II); în *centrul axei de simetrie* (e.g.: enzimele Hae III sau Hpa I).

Există şi endonucleaze care produc incizia moleculară la catena izolată de DNA, lăsând intact dc-DNA.

După "fragmentare" extremităţile libere ale catenelor moleculei dc-DNA pot fi:

a) *integral-complementare* - cu **"extremităţi netede"** (engl. "blunts ends" sau "flush ends; franc. "bouts francs") - în cazul inciziei moleculare centrice (pe axa de simetrie);

b) *parţial-complementare* - cu **"extremităţi coezive"** sau **"capete coezive"** (engl. "coesive ends"; franc. "bouts cohésifs" sau "bouts protrousifs") - în cazul inciziei moleculare paracentrice (de o parte sau alta a axei de simetrie).

Enzimele de restricţie - în special enzimele aparţinând sistemului R - M de tip II - pot determina tipurile de clivare moleculară decrise mai sus.

În fig.8-1 se prezintă efectele induse de două enzime de restricţie (endocnucleaze de restricţie) şi anume Hae III şi Eco R I .

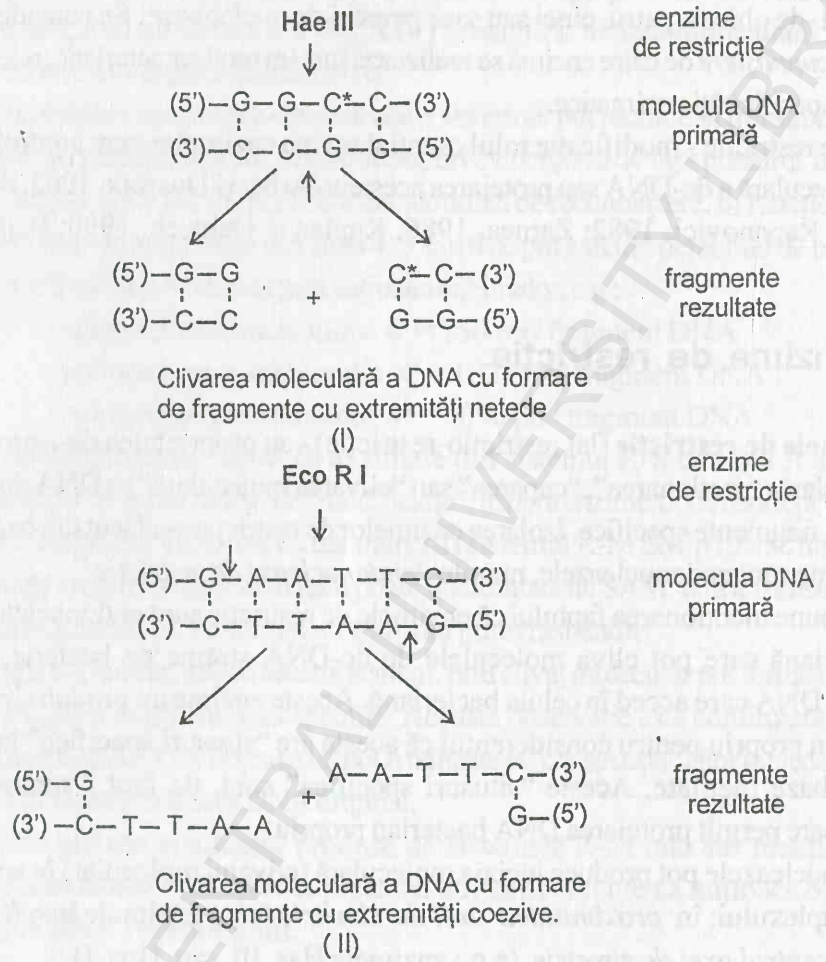


Fig.8-1. Geneza fragmentelor moleculare rezultate prin clivarea DNA cu enzime de restricţie (explicaţii în text)

Aceste enzime se caracterizează prin posibilitatea de reparare a unor "situsuri de recunoaştere" specifice pentru deoxiribonucleozidmonofosfaţi (dNMP) notaţi uzual doar prin nucleobaze (N) care pot fi A, G, C, T sau chiar una necunoscută. Acţiunea enzimelor asupra moleculelor de DNA primare conduce la geneza de fragmente moleculare diferite : cu extremităţi netede - sub acţiunea HAe III şi cu extremităţi coezive - sub acţiunea Eco R I.

BCU "ASCE" CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

În cazul formării fragmentelor dicatenare de DNA cu extremităţi coezive este posibilî legarea acestora la catene complementare. Această proprietate este utilizată în recombinarea genică in vitro.

Enzimele de restricţie care produc incizia moleculară (clivarea moleculară) cu generarea unor "extremitaţi coezive" pot asigura formarea în prspectivă a unei molecule de dc-DNA circular deschis. Acesta prezintă complementaritate pe porţiunea centrală (dicatenară) şi extremităţi libere pe porţiunile terminale (monocatenare), care pot realiza legături complementare cu alt dc-DNA deschis.

Conceptul referitor la "extremităţile coezive" este important pentru explicitarea genezei moleculelor de DNA recombinant.

O imagine a mecanismului de acţiune al enzimelor de restricţie, i.e. endonucleazele de restricţie, care contribuie la decelarea situsurilor de recunoaştere şi apoi produc clivarea moleculară a catenelor de dc-DNA străin, este prezentată în tabelul 8-1.

Situsul de recunoaştere (i.e. situsul specific) al secvenţelor din dc-DNA pentru fiecare enzimă de restricţie - produsă de o anumită bacterie - este, în mod obişnuit, unică. Situsurile de recunoaştere în cazul enzimelor de restricţie cuprind, în general, un număr de 4, 5 sau 6 perechi de deoxiribonucleotidmonofosfaţi (dNMP). In exprimarea coerentă se uzitează menţionarea perechilor de nucleobaze (e.g. A=T; G=C).

Enzimele de restricţie participă la obţinerea unor entităţi definite ca "DNA vector" şi "DNA pasager", care concură ulterior la procese de recombinare cu situs specific. În această manieră enzimele de restricţie stau *la baza strategiei de obţinere a DNA recombinant.*

Decelarea situsurilor de recunoaştere de către enzimele de restricţie relevă o particularitate unică: existenţa unei *simetrii rotaţionale duble* (pereche). Această simetrie conferă caracter *"palindromic"* catenelor de DNA dc.

Caracterul palindromic la baza căruia se află simetria rotaţională dublă - prezentă în natură - poate fi explicitat prin existenţa unor secvenţe similare pe catenele antiparalele ale dc-DNA. Similitudinea poate fi remarcată în cazul citirii primei catene în direcţia $C_{5'}$-$C_{3'}$, iar a secundei catene în direcţia $C_{3'}$-$C_{5'}$ (v. şi tabelul 8-1).

Investigaţiile asupra enzimelor de restricţie au arătat ă pot exista "*enzime izoschizomere*" care, au caracteristici asemănătoare izomerazelor. Un astfel de exemplu prezintă enzimele de restricţie Hpa II şi Msp I care au situsuri de recunoaştere identice (fig.8-2).

Secvenţa interesată în clivarea moleculară este tetranucleotidică. În ambele situaţii produşii de clivare rezultaţi sunt fragmente cu extremităţi coezive. Diferenţa rezidă în

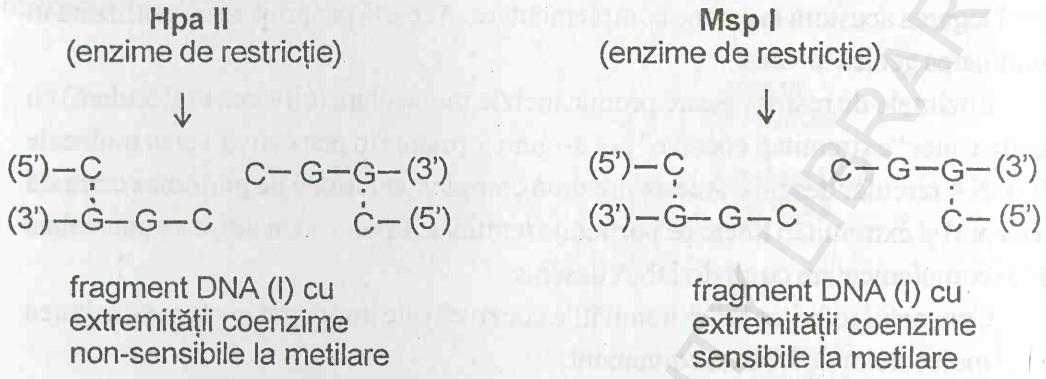


Fig. 8-2. Acțiunea enzimelor de restricție izoschizomere Hpa II şi Msp I

faptul că fragmentele rezultate în urma acțiunii Hpa II nu sunt sensibile la metilare, iar fragmentele produse în urma acțiunii Msp I sunt sensibile la metilare (v.fig.8-2).

Asupra enzimelor de restricție au fost efectuați şi studii privind secvența de aminoacizi, precum şi structura sterică (tridimensionale). Astfel, s-a arătat că, deşi există o mare diversitate a compoziției de aminoacizi, sub aspect steric s-a decelat existența unui centru catabolic care prezintă similitudini structurale. Acest centru catalitic este constituit din cinci catene polipeptidice β-pliate şi două catene polipeptidice α-helicale.

Mecanismul de acțiune ale enzimelor de restricție detip II - studiat pe diverse modele de clivare moleculară a DNA - a arătat că fragmentele rezultate au extremități de tipul (5')- fosfat şi (3')-hidroxil. Pentru acțiunea enzimelor de restricție este necesară prezența ionului Mg^{2+}, a moleculei de apă (HOH) care realizează atacul hidrolitic (nucleofil) urmat de scindarea legăturii fosfodiesterice. Acțiunea enzimelor de restricție (endonucleaze) este însoțită şi de acțiunea enzimelor de metilare (metilaze). Se reține faptul că toate interacțiile au loc în cadrul unui sistem de restricție-modificație.

Se poate exemplifica caracterul palindromic prin prezentarea similitudinii unor cuvinte sau expresii care scrise şi citite de la stânga la dreapta, sau de la dreapta la stânga, sunt identice, e.g.: radar.

8.2.1.2. Enzime de modificație

Enzimele de modificație (lat.modificatio - modificare, măsurare) - au proprietatea de-a proteja DNA dc propriu de acțiunea distructivă a propiilor enzime de restricție.

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Pentru a avea capacitatea de protejare la nivelul dc-DNA se produce metilarea (lentă) a unor nucleobaze. Astfel devine imposibilă recunoaşterea secvenţei de nucleotide din DNA. Secvenţele nucleotidice care conţin nucleobaze metilate sunt invulnerabile la obţinerea enzimelor de restricţie. Enzimele de modificaţie sunt enzime de metilare specifice pentru aceleaşi secvenţe (Sittman, 1994). Specificitatea de secvenţă rămâne un atribut atât al enzimelor de modificaţie cât şi al enzimelor de restricţie.

In general se poate afirma că descoperirea endonucleazelor de restricţie a făcut posibilă elaborarea tehnologiei DNA recombinant şi descoperirea de numeroase aplicaţii ale acestei tehnologii novatoare.

Endonucleazele au, de asemenea, un important rol în excizia şi repararea leziunilor la nivelul moleculei de DNA. Acest fapt are importanţă biomedicală interesând genetica moleculară, patologia biochimică etc.

Nomenclatura enzimelor de restricţie şi modificaţie se face literal şi numeric astfel: litera 1- indică genul bacteriei; literele 2-3 (sau 2-5) - indică specia; alte litere - indică tulpina bacteriană de proveniență a enzimei; numerele - indică ordinea de descoperire.

Aceste criterii sugerate de Nathans şi Smith (1973) au fost utilizate pentru definirea diverselor endonucleaze, e.g.: Eco R I de la Escherichia coli RY 13 ; Hpa I de la Hemophilus parainfluenzae I ; .Hpa II de la Hemophilus parainfluenzae II ; Alu I de la Arthrobacter luteus ş.a.m.d. (v. tabelul 8-1).

8.2.2. ENZIME DIN GRUPA DNA POLIMERAZELOR

Diversele DNA polimeraze au activităţi caracteristice şi sunt utilizate în investigaţiile din biologia moleculară şi, nu în ultimul rând, în studiul DNA recombinant.

Pentru cercetările în domeniul DNA recombinant au fost de mare utilitate diferite DNA polimeraze, distincte prin structura chimică şi activitatea biologică. Intre acestea se menţionează DNA polimerazele-DNA dependente şi DNA polimerazele-RNA dependente.

8.2.2.1. DNA polimeraze-DNA dependente

Sunt enzime care pot efectua copii complementare ale DNA matrice şi se pretează utilizării în varii domenii:

a)**Producerea de probe marcate**. In acest caz se utilizează deoxiribo-nucleozidtrifosfaţi (dNTP) radiomarcaţi sau chimiomarcaţi, care se folosesc ca *sonde moleculare*.

Tabel 8-1. Acţiunea enzimelor de restricţie cu situsurile de recunoaştere şi produsele de clivare moleculară (exemplificaţi în text).

Enzima de restricţie (denumire)	Originea	Situsuri de recunoaştere	Produşi de "clivare moleculară"	Extremităţile fragmentelor
Alu I	Arthrobacter luteus	(5')–A–G↓C–T–(3') (3')–T–C↑G–A–(5')	(5')–A–G (3')–T–C C–T–(3') G–A–(5')	netede
Bam H I	Bacillus amyloliquefaciens H	(5')–G↓G–A–T–C–C–(3') (3')–C–C–T–A–G↑G–(5')	(5')–G (3')–C–C–T–A–G G–A–T–C–C–(3') G–(5')	coezive
Bgl I	Bacillus globigii	(5')–G–C–C–N–N–N–N↓N–G–C–C–(3') (3')–C–G–G–N↑N–N–N–N–C–G–G–(5')	(5')–G–C–C–N–N–N–N (3')–C–G–G–N N–G–G–G–(3') N–N–N–N–C–G–C–(5')	coezive
Eco R I	Escherichia coli RY 13	(5')–G↓A–A*–T–T–C–(3') (3')–C–T–T–A–A↑G–(5')	(5')–G (3')–C–T–T–A–A A–A*–T–T–C–(3') G–(5')	coezive
Hae III	Haemophilus aeruginosus	(5')–G–G↓C*–C–(3') (3')–C–C↑G–G–(5')	(5')–G–G (3')–C–C C*–C–(3') G–G–(5')	netede
Hpa I	Haemophilus parainfluenzae I	(5')–C–A–A↓T–T–G–(3') (3')–G–T–T↑A–A–C–(5')	(5')–C–A–A (3')–G–T–T T–T–G–(3') A–A–C–(5')	netede
Hpa II	Haemophilus parainfluenzae II	(5')–C↓C*–G–G–(3') (3')–G–G–C↑C–(5')	(3')–C (5')–G–G–C C–G–G–(5') C–(3')	coezive
Msp I	Moraxella species	(5')–C↓C–G–G–(3') (3')–G–G–C↑C–(5')	(5')–C (3')–G–G–C C–G–G–(3') C–(5')	coezive
Sma I	Serratia mercescens	(5')–C–C–C↓G–G–G–(3') (3')–G–G–G↑C–C–C–(5')	(3')–G–G–C (3')–G–G–C C–(5') C–(5')	netede
Taq I	Thermus aquaticus	(5')–T↓C–G–A*–(3') (3')–A–G–C↑T–(5')	(5')–T (3')–A–G–C C–G–A*–(3') T–(5')	coezive

Nota: N – nucleobază neidentificată; (5') – extremitate 5' – terminală; (3') - extremitate 3' – terminală; * - atestă faptul că nucleobaza este metilată

Incorporarea în DNA se face în cursul sintezei cu ajutorul enzimei DNA polimeraza-DNA dependentă.

Marcarea prin încorporarea nucleotidelor în DNA nu schimbă semnificativ caracteristicile fizice ale DNA şi permite decelarea acestuia prin metode analitice. Astfel s-au obţinut sondele moleculare radiomarcate şi chimiomarcate.

După obţinere, DNA marcat se utilizează în numeroase cazuri, dintre acestea mai importantă fiind *metoda de hibridizare*.

b)**Secvenţializarea DNA**. Pentru secvenţializarea DNA, metoda curent practicată se bazează pe utilizarea DNA polimerazei-DNA dependente.

c)**Amplificarea DNA**. Utilizarea DNA polimerazelor-DNA dependente obţinute de la microorganisme termofile a făcut posibilă descoperirea şi extinderea unei metode automate de amplificare a segmentelor de DNA. Această metodă este cunoscută sub numele de reacţia în lanţ a polimerazei - PCR - (Polymerase Chain Reaction).

In principiu "metoda PCR" rezidă în amplificarea (multiplicarea) enzimatică a unei secvente de DNA dispusă între doi primeri oligonucleotidici, hibridizati fiecare cu una din catenele antiparalele ale fragmentului original. Pentru această metodă se foloseşte în mod curent DNA polimeraza termostabilă **Taq** denumită astfel după numele bacteriei termofile **Thermus aquaticus** de la care a fost izolată.

Alte DNA polimeraze. In Biochimia acizilor nucleici şi Biologia moleculară sunt cunoscute şi alte DNA polimeraze specifice procariotelor şi eucariotelor. Menţionarea acestora se face cu titlu informativ.

La procariote au fost decelate trei DNA polimeraze diferite structural şi funcţional, notate: pol I, pol II, pol III. Masele moleculare ale acestora cresc progresiv de la pol I la pol III, fiind 108.000 Da, 120.000 Da, respectiv 160.000 Da (Kornberg şi Kornberg, 1974).

La eucariote au fost decelate, de asemenea, trei DNA polimeraze notate prin alfa (α), beta (β) şi gama (γ). Acestea se deosebesc prin localizare, compoziţie, masa moleculară, activitate biologică. Fără a intra în alte detalii, se menţionează doar aspectele topobiochimice şi masa moleculară a DNA polimerazelor: alfa - prezentă în nucleu şi citoplasmă are masa moleculară 110.000- 220.000 Da; beta - aflată în nucleu are masa 45.000 Da; gama - existentă în nucleu şi mitocondrii cu masa moleculară 60.000 Da (Levin, 1980).

8.2.2.2. DNA polimeraze-RNA dependente

In această categorie se include reverstranscriptaza provenită de la ribovirusuri (RNA virusuri) tumorale. Această enzimă este o DNA polimerază-RNA dependentă

care poate determina producerea de DNA complimentar (cDNA) pornind de la o matrice de RNA mesager (mRNA).

Reverstranscriptaza este o enzimă care s-a dovedit utilă în decelarea secvenţelor de cDNA care sunt complementare pentru mRNA.

8.2.3. ENZIME DIN GRUPA DNA LIGAZELOR

Enzimele cunoscute sub numele de *polinucleotidsintetaze* sau *DNA - ligaze* au rolul de-a cataliza formarea de legături covalente fosfodiesterice între extremitătile 3'-hidroxil (3' -OH) şi 5'- fosfat (5' -H_2PO_3)ale unor fragmente de DNA cu extremităţi coezive. Energia necesară este asigurată de legăturile macroergice în urma scindării hidrolitice a unor compuşi furnizori de energie (e.g.: ATP).

Descoperirea DNA ligazelor s-a făcut în celulele procariotice la bacteria E. coli normale şi infectate cu bacteriofagul T4 (Gefter et al., 1967; Cozzarelli et al., 1977), remarcându-se rolul de sintetază în formarea catenelor poliheteronucleotidice la DNA constituit din fragmente scurte.

Rolul DNA ligazei se poate explica pornind de la existenţa a două extremităţi coezive provenite de la macromolecule de DNA diferite.

În fig.8-3 se exemplifică o astfel de situaţie: fragmente cu extremităţi coezive provenite de la două molecule, i.e. DNA (I) şi DNA (II) se obţin prin clivarea moleculelor produsă sub acţiunea endonucleazei de restricţie Eco R I. În continuare, sub acţiunea DNA ligazei din fragmentele cu extremităţi coezive provenite de la moleculele de DNA iniţiale - care pot fi considerate rest DNA (I) şi rest DNA (II) - se formează molecula de DNA recombinant.

Ulterior au fost descoperite DNA ligaze şi în celulele eucariotice - la animale şi plante. La animale DNA ligaza a fost izolată prima dată din splină şi timus de iepure (Lindhal şi Edelman, 1968). La plante a fost izolată din organele de înmulţire de la crin (Howell şi Stern, 1971). Ulterior a fost izolată şi din splină de la animalele domestice (porc, oaie ş.a.) de către Lindhal (1971).

In tehnologia DNA recombinant se utilizează DNA ligaze obţinute din E. coli (normale şi infectate cu bacteiofagul T4). Acţiunea enzimei se produce doar asupra DNA "clivat molecular" cu catene inegal-complementare (deci cu extremităţi "coezive"). Energia necesara e produsă prin transformarea ATP în AMP cu desfacerea legăturilor macroergice şi prin acţiunea coenzimelor nicotinamiddinucleotid (NAD^+) în nicotinamid-dinucleotidfosfat ($NADP^+$).

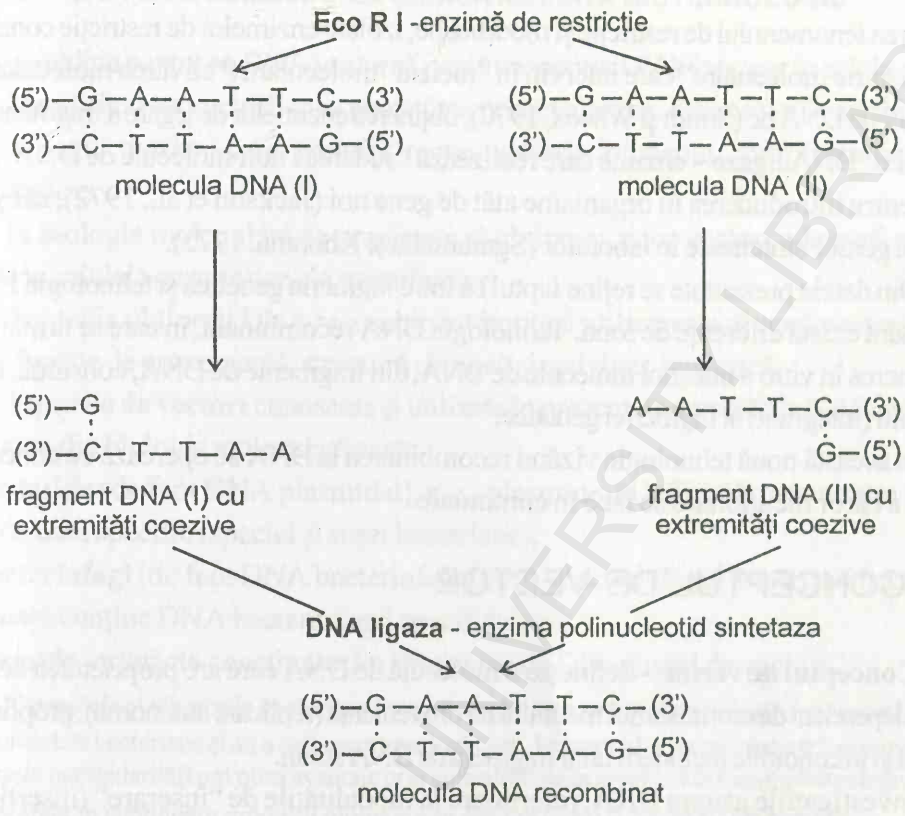


Fig. 8-3. Acțiunea enzimei de restricție și a enzimei DNA ligază în formarea moleculelor de DNA recombinat (detalii în text)

DNA ligaza utilizată în obținerea DNA recombinant are constanta de sedimentare (S_{20W}) de 45,2 S și masa moleculară de 74.000 Da. Viteza reacției enzimatice a DNA ligazei este maximă la 37°C, redusă la scăderea temperaturii, iar la temperaturi crescute (peste 45°C) se produce inactivarea enzimei.

8.3. STRATEGIA OBTINERII DNA RECOMBINANT

8.3.1. PRINCIPII GENERALE

Apariția și dezvoltarea **"tehnologiei DNA recombinant"** a fost posibilă grație cercetărilor cu caracter interdisciplinar din domeniul biochimiei, microbiologiei, geneticii, fizicii și fizico-chimiei. In acest context se pot reaminti momente marcante cum ar fi:

BCU IAȘI/CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

descoperirea fenomenului de restricţie şi modificaţie; izolare enzimelor de restricţie considerate ca "bisturie moleculare" care intervin în "incizia" moleculară ("clivarea moleculară") moleculelor de DNA dc (Smith şi Wilcox, 1970); obţinerea enzimelor de legare a fragmentelor de DNA, i.e. DNA ligaze - enzime care realizează "sudarea" noii molecule de DNA, fapt valabil pentru introducerea în organisme atât de gene noi (Jackson et al., 1972), cât şi de fragmente genice sintetizate în laborator (Sgaramella şi Khorana, 1972).

Din datele prezentate se reţine faptul ca între ingineria genetică şi tehnologia DNA recombinant există diferenţe de fond. Tehnologia DNA recombinant, în care se urmăreşte doar obţinerea în vitro a unei noi molecule de DNA, din fragmente de DNA, constituie doar un domeniu (integrant) al ingineriei genetice.

In această nouă tehnologie vizând recombinarea la DNA se operează cu concepte specifice a căror menţionare se face în continuare.

8.3.2. CONCEPTUL DE VECTOR

Conceptul de vector - defineşte o moleculă de DNA care are proprietatea de a se replica independent de cromosomul mediului de proveniență (replicare autonomă), proprietate menţinută şi în condiţiile includerii unui fragment de DNA străin.

Investigaţiile asupra DNA, referitoare la modalităţile de "inserare" (inserţie) şi "transportare" în genom a numeroase celule-gazdă au premers definirea conceptului de vector.

Vectorul - denumit uneori şi "vehicul" sau "DNA vector" - reprezintă o entitate bine circumscrisă cu care se operează în tehnologia DNA recombinant. Vectorii trebuie să aibă anumite caracteristici esenţiale - comune tuturora şi caractetistici specializate - care diferenţiază tipurile de vectori.

Caracteristicile esenţiale - comune tuturor vectorilor - indiferent de tipul acestora şi de proveniență rezidă în faptul că trebuie să prezinte următoarele atribute:

a) să prezinte o moleculă de *dimensiuni reduse;*
b) să aibă *posibilitatea de replicare* autonomă în celulele gazdă;
c) să posede capacitatea de inserţie în celule-gazdă, cunoscându-se faptul că în prezent există numeroase tehnici de investigare a DNA în diverse celule;
d) să aibă un *marker selectabil*, cunoscându-se că inserarea DNA în celulă este deseori un proces cu eficienţă redusă. Din acest motiv este necesară selectarea acelor celule în care s-a făcut inserţia din cadrul unei vaste populaţii celulare;
e) să prezinte *o regiune pentru legarea* DNA pasager (i.e. DNA ţintă). Aceasta este de

fapt condiția pentru ca DNA vector să poată transporta DNA-pasager în celula gazdă.

Identificarea vectorilor se poate face prin evaluarea: rezistenței la antibiotice; existenței unui marker care permite recunoașterea, prezența complementarității nucleobazelor.

In biologia moleculară se urmărește și obținerea unor vectori adecvați pentru replicare în celulele eucariotice ale mamiferelor.

Strategia obținerii DNA recombinant implică utilizarea a diverși vectori, care diferă în funcție de proveniență, structură chimică și activitate biologică.

Tipurile de vectori cunoscute și utilizate în prezent, în cercetările fundamentale și aplicative din biologia moleculară sunt:

1) **plasmide** (de fapt DNA plasmidal), e.g.: plasmide de la E. coli care conțin DNA plasmidal specific (speciei și sușei bacteriene);
2) **bacteriofagi** (de fapt DNA bacteriofagal), e.g.: bacteriofagul λ (virusul bacterian λ) care conține DNA bacteriofagal specific;
3) **cosmide** -artefacte constituite din fragmente de DNA cu rol de vectori.

Plasmidele și virusurile bacteriene (bacteriofagii) care se pretează utilizării ca vectori se pot replica în celulele bacteriene și au o rată mare a multiplicării. La cosmide rata multiplicării este mult mai mare. Aceste particularități pot oferi avantaje prin aplicabilitate la nivel industrial (biotehnologic). Așa cum se va arăta în continuare produsul biologic nou obținut poate fi "reperat" de pasager.

8.3.2.1. Plasmidele

Plasmidele (gr. plasma - formațiune) - sunt formațiuni bacteriene extracromosomiale capabile de replicare independentă. Conțin cca. 0,5-2% din totalul de DNA celular procariotic.

S-a constatat că **DNA plasmidal** are conformație de DNA dc circular, lipsit de histone. A fost izolat din celulele procariotice (e.g.: Escherichia coli) și chiar eucariotice (e.g.: Drosophila melanogaster, Zea mays). Plasmidele diferă de la o celulă la alta prin secvența nucleobazelor și dimensiunile DNA.

Plasmidele conțin un DNA dc specific care -prin secvența nucleotidelor- stochează informații cu implicare în diverse procese metabolice legate de: fertilitate, rezistența la antibiotice (antibiorezistența); rezistența la radiații UV, producția de antibiotice, tumorigenicitate la plante, oncogenitate la animale și om, fenomenul de restricție - modificație ș.a.

Plasmida, în speță DNA plasmidal, a fost primul vector de clonare utilizat în tehnologia DNA recombinant. In prezent plasmidele se utilizează curent ca vectori în

obţinerea DNA recombinant. Pentru evaluare DNA plasmidal se raportează la un anumit standard. Spre exemplu, ca *standarde* se utilizează:

a) *DNA - dicatenar* - la care s-a stabilit corespondenţa lungime DNA dc - masă moleculară aceasta fiind de 1nm corespunzător la 1MDa (MDa = 10^6Da);

b) *DNA din bacteriofagul λ* - care are masa moleculară de 30,8 MDa.

Vectorul plasmidal cu reperezentabilitate maximă este vector pBR322, descoperit de Bolivar et al. (1977), care are o masă moleculară relativ redusă 2,88 . 10^6 Da şi conţine 4362 pb. Prezintă doi markeri de selecţie reprezentaţi de: gena de rezistenţă la ampicilină şi gena de rezistenţă la tetraciclină. Acest vector a fost utilizat pentru obţinerea somatostatinei, hormonului de creştere uman, interferoni umani (Hu-INF), insulinei ş.a. Produşi rezultaţi ca urmare a aplicaţiilor biotehnologice ale biologiei moleculare (v. Cap. 9).

Importante pentru biologia moleculară sunt caracteristicile morfo-funcţionale ale plasmidelor . Dintre acestea se menţionează:

- capacitatea de replicare autonomă: separat de bacteria-gazdă sau în bacteria-gazdă;
- posibilitatea de a fi purtători de DNA plasmidal care poate codifica biosinteza proteinelor conferind gazdei rezistenţa la antibiotice (antibiorezistenţă). Genele de antibiorezistenţă sunt markeri selectabili.

Evaluate sub raport biologic plasmidele pot fi considerate ca:

- factori de sex (F şi F'), e.g.: F' - lac cu masa 69 MDa;
- factori de antibiorezistenţă (R), e.g.: R1 cu masa 59 MDa;
- colicinogeni (obţinuţi de la E. coli); e.g.: E_1 - Col cu masa 4,8 MDa; E_2 - Col cu masa 6,0 MDa.

Sub aspect conformaţional heteroduplexul DNA plasmidal poate fi: dc-DNA circular închis supertorsionat; DNA dc circular închis; dc-DNA linear.

Pentru evaluarea acestor forme se determină coeficienţii de sedimentare - S_{20w} evaluaţi în unităţi Svedberg (S) dar raportaţi la molecule de DNA cu conformaţie de heteroduplex linear considerată ca referinţă. Acesta are un coeficient de sedimentare relativ - $S_{20w(f)}$ cu valoarea 1,00 S. In raport cu acesta heteroduplexul circular închis are valoarea 1,14 S, iar *heteroduplexul circular închis supertorsionat* (supraîncolăcit) are valoarea 1,42 S (valori măsurate în mediu neutru). Astfel de date permit evaluarea fizico-chimică (indirectă) a conformaţiilor moleculelor de DNA plasmidal utilizat în tehnologia DNA recombinant.

Separarea DNA plasmidal de DNA cromosomal este un important pas premergător utilizării ca vector. Separarea se bazează, în principal, pe faptul că *DNA plasmidal* prezintă o conformaţie de heteroduplex circular închis şi o masă moleculară mult mai redusă, în raport cu DNA cromosomal care are conformaţii de heteroduplex

circular deschis şi masa moleculară mare. Evident la acestea se adaugă diferenţa de conţinut în nucleobaze (e.g. cuantumul perechii G-C) datorită căruia se modifică densitatea.

Aceste particularităţi de compoziţie şi structură au facilitat perfectarea unor procedee de separare bazate pe metode fizico-chimice :

a) **centrifugarea la turaţie redusă** după liza celulară cu substanţe tensioactive de tipul detergenţilor ionici (e.g. polihidroxietilenetileter). In această situaţie DNA plasmidal rămâne în supernatant iar DNA cromosomal în sediment;

b) **cromatografia pe coloană de albumină metilată** - se bazează pe diferenţele de masă moleculară. Evident în cursul cromatografiei DNA plasmidal eluează primul.

c) **centrifugarea în gradient de densitate** - bazată pe diferenţele de densitate datorate cuantumului de perechi de baze G-C, e.g.: DNA plasmidal conţine G-C în proporţie de 45-55% şi densitatea de 1,704-1,718 g/cm^3, iar DNA cromosomal al aceleiaşi celule diferă (fiind mai mare sau mai mic), fapt care permite separarea.

d) **centrifugarea în gradient de densitate** după tratarea moleculelor de DNA cu **coloranţi** bazici (e.g.: acridinorange, albastru de toluidină, bromură de etidiu). Aceşti coloranţi constituiţi din molecule mici se intercalează între nucleobazele superpozabile din DNA producând extensia şi distorsia macromoleculei. In cazul DNA plasmidal cu conformaţie de heteroduplex închis intercalarea este mai dificilă (rotaţia liberă a capetelor catenei duble fiind absentă) şi se fixează un cuantum mai redus de coloranţi. In secundul caz, DNA cromosomal fixează cantităţi mai mari de coloranţi fapt care va schimba în măsură mai mare masa moleculară şi densitatea. Aceste particularităţi ale interacţiilor date de tipurile de DNA în discuţie vor asigura o mai eficientă separare prin centrifugare în gradient de densitate.

Vectorul de tip DNA plasmidal astfel separat poate fi pregătit pentru aplicare în tehnologia DNA recombinant.

Principalele utilizări ale plasmidelor în clonare pot interesa: a) clonarea unor fragmente de dc-DNA care sunt mai mici decât 10 kb; b) producerea unor biblioteci de cDNA (DNA dublu catenar-copie pornind de la o catenă de mRNA.

8.3.2.2. Bacteriofagii

Bacteriofagii sunt viruşi care infectează bacteria. In organismul bacteriei aceşti viruşi se dezvoltă realizându-se o "comunitate biologică" de tipul bacterie-bacteriofag. In acest mod se asigură bacteriofagilor: a) precursori chimici necesari biosintezelor în urma cărora rezultă bioconstituenţi proprii; b) energia necesară proceselor cata- şi

anabolice; c) mediul propice care facilitează biocataliza în procesele metabolice.

In organismul bacteriei-gazdă bacteriofagii - mai precis **DNA bacteriofagal** (care poate fi denumit şi DNA coreal - provenind din core viral) - se pot replica independent. Acest proces, după cum se poate observa, este întâlnit atât la DNA bacteriofagal cât şi la DNA plasmidal.

La modul general, se poate afirma că şi bacteriofagii prezintă o seamă de **caracteristici** morfo-funcţionale de interes major pentru biologia moleculară:

- bacteriofagii -având calitatea de materie vie acelulară - se pot replica în celula-gazdă specifică;
- în cursul replicării, bacteriofagii - în funcţie de tipul acestora - pot avea: conformaţie dicatenară (dc-DNA) - majoritatea tipurilor sau conformaţie monocatenară (mc-DNA) - în puţine cazuri;
- bacteriofagii pot fi propagaţi într-un mare număr (câteva sute pe celulă);
- în celula bacteriană evoluţia bacteriofagilor poate să urmeze ciclul litic sau ciclul lizogenic.

Bacteriofagul λ conţine un DNA bacteriofagal cu masa moleculară de 31.10^6 Da şi cca 40-50 gene. In cadrul sintezelor genice se află gene de ataşare (att), integrare (int), recombinare generală (exo) ş.a.

In relaţia DNA cromosomal bacterian - DNA bacteriofagal λ s-a constatat că de fapt există două moduri de dezvoltare în cadrul ciclului evolutiv: fie un *ciclu litic*, fie un *ciclu lizogenic*.

Ciclul litic - este caracterizat prin replicaţia DNA bacteriofagal λ cu multiplicare şi geneza finală a unor formaţiuni mature, respectiv bacteriofagul λ (virusul) independent care se eliberează prin liza celulară.

Ciclul lizogenic - este la rândul său caracterizat printr-o replicaţie pasivă a unui DNA bacteriofagal λ represat (fapt care a condus la denumirea de profag λ sau probacteriofag λ). In acest caz replicarea pasivă se realizează prin integrarea DNA bacteriofagal λ în DNA cromosomal bacterian (deci al gazdei) şi se continuă cu o multiplicare concomitentă. Astfel se realizează lizogenia - ca formă de dezvoltare non-destructivă în care bacteriofagul λ este "rezident" al bacteriei.

Remarca esenţială în evaluarea mecanismelor de replicaţie bazate pe ciclul litic şi ciclul lizogenic (Gârban, 1992), rezidă în faptul că în cazul lizogeniei există similitudine cu replicarea la plasmide. In această situaţie este posibilă utilizarea, în condiţii de securitate, cu evitarea biohazardului, a bacteriofagului λ în tehnologia DNA recombinant.

In cazul stării de profag λ sau probacteriofag λ (caracteristică lizogeniei), DNA bacteriofagal λ are genele blocate de un represor. Eliberarea DNA bacteriofagal λ se

poate face sub acţiunea unor enzime de restricţie mai cunoscute fiind Eco RI (care formează 6 fragmente nucleotidice) şi Hinf I (care formează 4 fragmente nucleotidice). După fragmentare (clivarea moleculară a DNA) intervine gena *att* care poate determina ataşarea aşa numitelor "capete coezive" ale DNA bacteriofagal λ la DNA cromosomal bacterian.

Vectorii cu provenienţă de DNA bacteriofagal λ se pot ataşa diferitelor fragmente de DNA cromosomal. Din bacteriofagul λ s-au construit bacteriofagi cu proprietăţi de vector dominanţi "bacteriofagi Charon" (denumire dată după personajul din mitologia greacă, implicat în trecerea Styxului) au proprietăţi specifice, e.g.: transportul unor fragmente de DNA de diverse mărimi, efecte de deleţie genică ş.a. Bacteriofagii derivaţi (construiţi) de tip Charon s-au dovedit extrem de eficienţi în tehnologia DNA recombinant.

Principalele utilizări ale bacteriofagilor în clonare pot viza următoarele obiective: a) clonarea în fragmente mai mari a DNA dc, având peste 20kb; b) producerea unei biblioteci de DNA dc genomic; c) producerea unei biblioteci de cDNA; d) obţinerea de DNA mc (monocatenar) pentru lucrări de secvenţializare a moleculei.

8.3.2.3. Cosmidele

Cosmidele, descoperite pentru prima dată de către Collins şi Holm (citaţi de Maniatis et al., 1982), au fost desemnate ca vectori specifici pentru clonarea unui mare număr de fragmente de DNA cromosomal eucariotic. Denumirea de cosmidă (engl. cohesive-coeziv şi site-poziţie, loc) derivă din iniţialele "co" şi "s", pentru a exprima termenii de "cohesive" şi "sites" (de fapt "end sites", poziţii terminale).

Structural cosmida este constituită dintr-o plasmidă (DNA plasmidal) care provine de la o bacterie obişnuită şi o "regiune cos" (cu proprietăţi coesive) care derivă din genomul bacteriofagului λ (DNA bacteriofagal) reprezentată de câteva nucleotide.

Cosmidele astfel formate mai prezintă unul sau mai multe situsuri susceptibile la acţiunea enzimelor de restricţie. La nivelul acestor situsuri, după incizia moleculară (clivaj), pot fi inserate fragmente de DNA reprezentând gene (procariotice şi chiar eucariotice).

Deci, se poate conchide că în cosmidă coexistă *DNA plasmidal* şi *DNA bacteriofagal*, structurate in vitro prin legarea coezivă a părţii terminale. Inserţia fragmentelor de DNA (i.e.: DNA pasager) reprezentând gene se face în urma acţiunii enzimelor de restricţie.

In laboratoare a fost obţinută cosmida pBTI-I, care are masa moleculară de $7{,}3 \cdot 10^6$ Da, conţine aproximativ 11.000 pb. Pentru incizia moleculară (clivaj) se poate folosi enzima de restricţie Bam H-I. Utilizată ca vector cosmida pBTI-I poate asigura

clonarea unor fragmente mari de DNA care au 27.000 - 41.000 pb. Se pretează pentru clonarea unor fragmente mari de DNA în E. coli sau în celule de drojdie.

Cosmidele întrunesc cele mai eficiente calităţi ale plasmidei şi bacteriofagului caracterizate prin:

- mărimea redusă - atribut al plasmidelor;
- capacitatea de tranzitare a peretelui celulei bacteriene - atribut al bacteriofagului λ.

Astfel devine posibilă clonarea unor fragmente de DNA mai mari (până la 45kb). Se estimează că o bacterie în care s-a inserat o cosmidă produce o cantitate de proteine de cca 100.000 mai mare comparativ cu o bacterie care are o plasmidă obişnuită.

La selectarea unui vector de clonare se are în vedere tipul de vector (plasmidă, bacteriofag, cosmidă) particularităţile tehnologiei DNA recombinant din celula-gazdă. In tabelul 8-2 se prezintă câţiva vectori de clonare conform datelor compilate din literatura de specialitate (după Alberts et al., 1983; Rawn, 1989; Kaplan şi Delpech, 1990).

Datele expuse relevă rolul şi importanţa utilizării unor vectori de clonare - distincţi prin structura chimică şi activitatea biologică - în tehnologia DNA recombinant.

8.3.3.CONCEPTUL DE PASAGER

Conceptul de pasager defineşte un fragment dintr-o moleculă de DNA - cu o anumită secvenţă de nucleobaze - care reprezintă gena purtătoare a informaţiei biologice necesare pentru biosinteza unui anumit produs (e.g: hormoni, enzime, proteine diverse).

Pasagerul - denumit şi *"DNA pasager"* sau *"DNA ţintă"* - deţine prorietatea de **integrare** într-un vector adecvat constituind aşa numitul "DNA recombinant". In aceste condiţii poate avea loc replicaţia, în celulele gazdă, cu menţinerea informaţiei care asigură biosinteza produsului preconizat.

Deci, se poate conchide că odată cu replicarea repetată (numită adesea şi "multiplicare") a DNA recombinant în celulele gazdă se realizează şi "multiplicarea" produsului biologic controlat sub raport informaţional.

Pasagerii utilizaţi în tehnologia DNA recombinant se obţin prin diferite metode:

1) clivajul (incizia) moleculară a DNA cromosomal într-un mare număr de fragmente - iar apoi fragmentele identificate structural şi funcţional se transferă în vector;
2) biosinteza unui DNA complementar (cDNA) pe o matriţă de RNA mesager (mRNA), proces în care intervine ca enzimă specifică reverstranscriptaza (DNA polimeraza-RNA dependentă);
3) sinteza chimică organică (în laborator) a unei molecule de DNA cu secvenţă de

nucleobaze cunoscută, reprezentând structura unei gene care urmează a fi transferată în vector.

Metodele expuse mai sus fac obiectul tratatelor de strictă specialitate interesând sub raport teoretic, dar şi sub raport pragmatic laboratoarele de profil. Detalii procedurale sunt expuse în tratate (Alberts et al., 1983; Darnell et al., 1986; Kaplan şi Delpech, 1990) şi manuale de laborator (Maniatis et al., 1982) care conţin colecţii de protocoale de laborator.

Replicaţia DNA recombinant ca entitate de tipul "vector - pasager" se realizează într-un anumit "sistem genetic" denumit în mod curent *celula-gazdă*.

In prezent cercetările se efectuează pe celule-gazdă din specia Escherichia coli menţinută şi dezvoltată în culturi bacteriene. Se cunosc în prezent peste 1000 tulpini de E. coli, în mare majoritate nepatogene. Există însăşi unele tulpini patogene pentru tractul urinar şi chiar digestiv. Obişnuit E. coli se află în intestinul gros la animalele homeoterme şi la om în proporţii de 1-100.000.000 celule/g conţinut intestinal. De asemenea, s-au decelat în sol şi apă - ca o consecinţă a contaminării arealului habitual.

In domeniul tehnologiei DNA recombinant se lucrează cu o tulpină specială E. coli - tulpina K12 care a fost menţinută în laborator şi care şi-a pierdut proprietatea de a coloniza intestinul şi de a produce îmbolnăviri.

După anii '70 s-a încercat şi un alt "sistem genetic", acela prezentat de Bacillus subtilis - un microorganism, răspândit natural în sol, care are proprietatea de sporulare. Cercetările nu au prezentat evoluţii notabile de interes pentru tehnologia DNA recombinant.

8.3.4. FORMAREA MOLECULELOR DE DNA RECOMBINANT

Obţinerea vectorului şi pasagerului, ca formaţiuni biologic active, reprezintă etape precursoare ale sintezei DNA recombinant (fig. 8-1). In exemplul nostru vectorul este reprezentat de DNA plasmidal dintr-o celulă procariotică (bacteriană), iar pasagerul provine dintr-un fragment de DNA cromosomal dintr-o celulă eucariotică umană.

Vectorul reprezentat de *DNA plasmidal, DNA bacteriofagal* sau *DNA cosmidal* după clivajul (incizia) moleculară a DNA dc circular închis prin acţiunea endonucleazelor de restricţie este compatibil pentru interacţie cu pasagerul.

La rândul său *pasagerul*, numit uneori şi *"DNA pasager"* sau *"DNA ţintă"*, este obţinut prin DNA cromosomal tot prin acţiunea endonucleazelor de restricţie care în

urma multiplelor clivaje (incizii) moleculare crează aşa numita "bibliotecă de DNA". Aceasta este constituită din numeroase fragmente dintre care se repereză DNA pasager (i.e. gena selectată) pentru obţinerea DNA recombinant.

In explicitarea noţiunilor referitoare la DNA convenim a acredita termenii de "cromosomal", "plasmidal", "bacteriofagal", "cosmidal", în intenţia de unificare a terminologiei uzitate în limba română.

Cu titlu informativ se menţioneaza că în unele publicaţii apar termenii "plasmidic", "bacteriofagic" ş.a. In general, diversitatea terminologică pentru aceeaşi noţiune poate impieta asupra inteligibilităţii textului şi poate, uneori, conduce chiar la confuzii.

Tabel 8-2. Vectori de clonare şi domeniile de utilizare

Tipul de vector	Denumirea vectorului	Criteriu de selecţie sau de screening	Celula gazdă	Domenii de utilizare
Plasmide	pBR322	amp^R ter^R	E. coli	Formarea unei biblioteci de DNA genomic
	pUC18	amp^R	E. coli	Vector de expresie
	pAH9	amp^R LEU 2	E. coli Drojdie	Vector de expresie pentru drojdie
	pmh2	amp^R $neomicină^R$	E. coli Agrobacterium	Vector de expresie pentru celule vegetale
	psv2-dhfr	amp^R $metotrexat^R$	E. coli Maimuţă	Vector de expresie pentru celule animale
Bacteriofagi	λEMBL3	Împachetarea moleculei în Vitro	E. coli	Formarea unei biblioteci de cDNA genomic
	λgt10	cI	E. coli	Clonarea cDNA Hibridizarea
	λgt11	cromatic albastru/alb	E. coli	Clonarea cDNA Vector de expresie Screening de anticorpi
Cosmide	pcos2EMBL	amp^R $Kanamicină^R$	E. coli	Formarea unei biblioteci de cosmide
	pMMB33	amp^R $Kanamicină^R$	Bacterie Gram negativă	Transferul DNA genomic Deplasare de cromosomi
	pBTI-I	amp^R	E. coli Drojdie	Transfer DNA genomic

BCU IAŞI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Interacția dintre vector și pasager (considerat ca "piesă a DNA străin") are loc în prezența enzimei DNA ligaza și este urmată de constituirea (formarea) DNA recombinant. Detalii asupra interacției dintre vector - în cazul respectiv DNA plasmidal și pasager - reprezentat printr-un fragment de DNA cromosomal se prezintă în fig. 8-4.

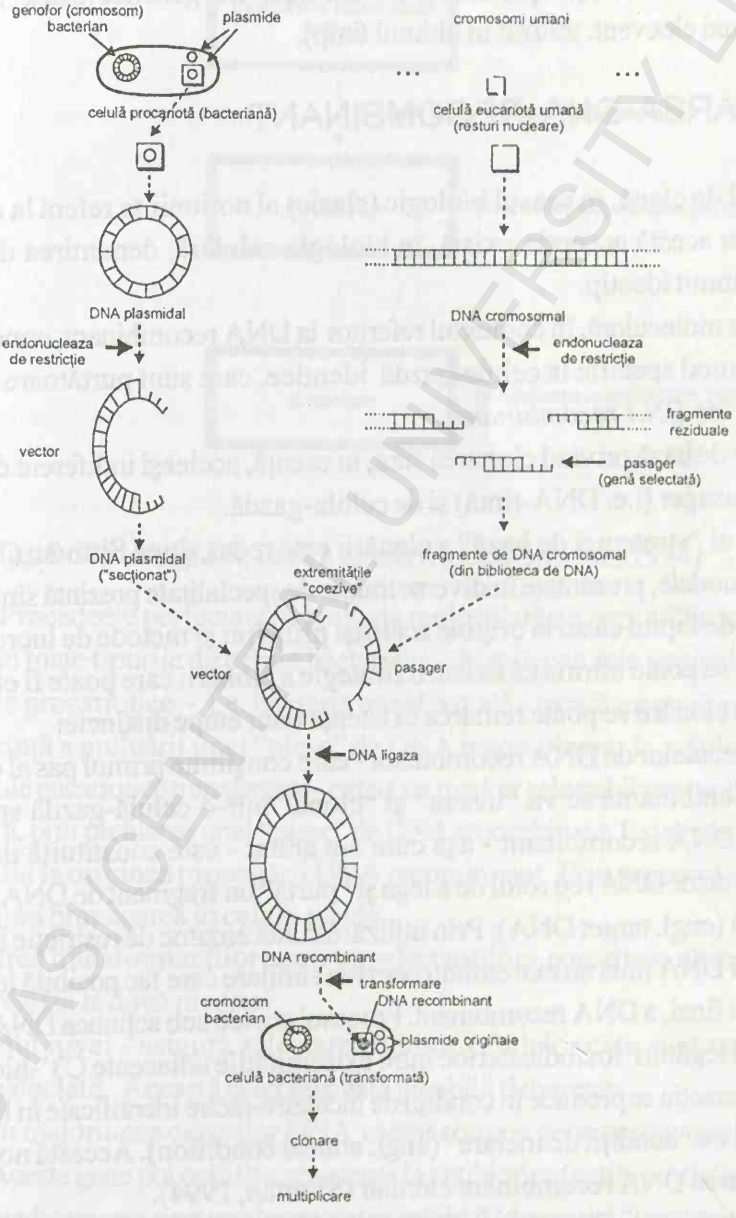


Fig. 8-4. Mecanismul de formare a DNA recombinant prin interacția dintre DNA plasmidal și un fragment de DNA cromosomal (explicații în text)

BCU IASI/CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

In continuare intervine o etapă de transformare şi transfecţie în celule bacteriene de E. coli. Apoi se realizează clonarea şi multiplicarea.

Metodele uzitate în obţinerea DNA recombinant in vitro se rezumă la un complex de procedee care permit intervenţia directă asupra moleculelor de DNA. Acest complex de procedee constituie aşa numita "tehnologie a DNA recombinant" - denumire introdusă de Grobstein (1977) şi reprezintă o latură a ingineriei genetice (sau a "ingineriei genice" - termen mai elocvent, utilizat în ultimul timp).

8.3.5. CLONAREA DNA RECOMBINANT

Conceptul de clonă, în sensul biologic (clasic) al notiunii se referă la celule cu *genotip identic*. In acestă accepţie există, în biologia celulară, denumirea de "clonă celulară" a unui anumit ideotip.

In biologia moleculară, în contextul referitor la DNA recombinant, conceptul de clonă se referă în mod specific la celule-gazdă identice, care sunt purtătoare ale unor *molecule identice de DNA recombinant*.

Principiile de bază privind clonarea sunt, în esenţă, aceleaşi indiferent de DNA-vector, de DNA-pasager (i.e. DNA-ţintă) şi de celula-gazdă.

Un model al "strategiei de bază" a clonării este redat, după Sittman (1990), în fig. 8-5. Astfel de modele, prezentate în diverse tratate de specialitate prezintă similitudini notabile explicate de faptul că au la origine aceleaşi principii şi metode de lucru.

In general, se poate afirma că există o strategie a clonării care poate fi etapizată. In cadrul strategiei clonării se poate remarca existenţa unor etape distincte:

a) formarea moleculelor de DNA recombinant - care constituie primul pas al clonării. Molecula recombinantă se va "insera" şi "clona" într-o celulă-gazdă specifică. Molecula de DNA recombinant - aşa cum s-a arătat - este constituită din DNA vector (engl. vector DNA) cu rolul de a lega şi "purta" un fragment de DNA pasager sau DNA ţintă (engl. target DNA). Prin utilizarea unei enzime de restricţie identice, DNA vector şi DNA ţintă au extremităţi coezive similare care fac posibilă legarea şi constituirea, în final, a DNA recombinant. Procesul are loc sub acţiunea DNA ligazei care formează legături fosfodiesterice între extremităţile adiacente C3'-hidroxil şi C5'-fosfat. Interacţia se produce în condiţii de încălzire-răcire identificate în literatura de specialitate cu "condiţii de inelare" (engl. anneal condition). Această noţiune se referă la formarea DNA recombinant circular (Sittman, 1994).

b) inserarea şi propagarea DNA recombinant în celule-gazdă - reprezintă o secundă

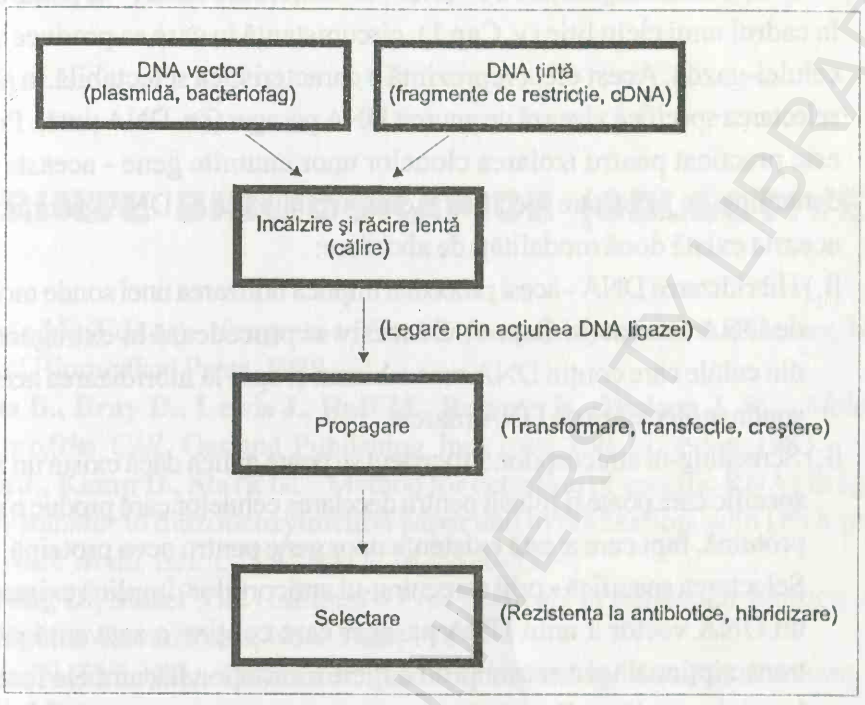


Fig. 8-5. Strategia de bază a clonării (după Sittman, 1994)

etapă. Procedeele perfectate în biologia moleculară au permis "inserarea" DNA în aproape toate tipurile de celule bacteriene, chiar în celulele vegetale şi animale. In celulele procariotice - i.e. bacteria transformată - există un marker selectabil ca o consecinţă a preluării unei "piese" de DNA recombinant. In celulele eucariotice - i.e. celule eucariotice transfectate - există un marker selectabil provenit, într-o manieră similară, prin preluarea unei "piese" de DNA recombinant. Existenţa acestor markeri se va afla la originea propagării DNA recombinant. Prin procesul de replicaţie, se va asigura propagarea în celula-gazdă.

c) selectarea transformanţilor sau a transfectanţilor - constituie ultima etapă care se poate realiza la două niveluri:

1) primul nivel - asigură selectarea tuturor celulelor care sunt transformate sau transfectate. Această selectare este posibilă deoarece:

α) în majoritatea cazurilor DNA vector conţine gene pentru markeri selectabili. Aceste gene pot codifica rezistenţa la antibiotice (antibiorezistenţa) sau la unele medicamente care produc moartea celulară (denumită "tanatocitoză" în accepţia terminologiei utilizată în acest volum);

β) în cazul bacteriofagilor, DNA vector - în numeroase cazuri - se poate dezvolta în cadrul unui ciclu litic (v. Cap 1), circumstanţă în care se produce moartea celulei-gazdă. Acest efect reprezintă o caracteristică selectabilă.In acest caz selectarea specifică vizează un anumit DNA pasager (i.e. DNA ţintă). Procedeul este practicat pentru izolarea clonelor unor anumite gene - aceasta explică denumirea de "selectare specifică" - dintr-o bibliotecă de DNA genomic. Pentru aceasta există două modalităţi de abordare:

β_1) Hibridizarea DNA - acest procedeu implică utilizarea unei sonde moleculare de DNA marcat (v. Cap. 4). Succesiv se procedează la extragerea DNA din celule care conţin DNA recombinant şi apoi la hibridizarea acestuia cu sonda moleculară de DNA marcat

β_2) Screening-ul anticorpilor. Procedeul se poate aplica dacă există un anticorp specific care poate fi folosit pentru decelarea celulelor care produc o anumită proteină, fapt care atestă existenţa unor gene pentru acea proteină.

Selectarea specifică - prin screening-ul anticorpilor- implică existenţa într-un DNA vector a unui DNA pasager care conţine o secvenţă promotor transcripţională şi o secvenţă de iniţiere translaţională, ambele funcţionale în celula-gazdă (v. Cap. 9). In această circumstanţă este posibilă biosinteza unei proteine care este codificată de DNA pasager.

2) secundul nivel - permite selectarea doar pentru celulele care au preluat DNA recombinant conţinând un DNA ţintă specific.

Detalii procedurale sunt expuse în diversele manuale şi tratate de specialitate (Maniatis et al., 1982; Alberts et al., 1983; Darnell et al., 1986; Davidson şi Sittman, 1994).

In fine, se poate afirma că - în ansamblul său - "recombinarea genică mediată biotehnologic" s-a constituit ca domeniu de sine stătător al Biologiei moleculare. Acest fapt a impus, pe de o parte profunda cunoaştere a proceselor biologice, iar pe de altă parte stăpânirea procedeelor tehnologice.

Datele prezentate cu referire la mijloacele operatoare ca şi la strategia necesară în tehnologia DNA recombinant oferă un cadru de înţelegere a specificului metodologic, a acurateţei dar şi a biohazardului la care pot conduce posibile inadvertenţe documentare (literatură, aparatură) şi erori experimentale.

BCU "SERBAN CANTACUZINO" LIBRARY

REFERINTE BIBLIOGRAFICE (SELECTIVE)

1. **Alacevic M.** (Editor) – *Progress in Environmental Mutagenesis*. Elsevier, North-Holland Biomedical Press, 1980.
2. **Alberts B., Bray D., Lewis J., Raff M., Roberts K., Watson J. D.** – *Molecular Biology of the Cell.* Garland Publishing, Inc., New York - London, 1983.
3. **Alwine J., Kemp D., Stark G.** – Method for detection of specific RNAs in agarose gels by transfer to diazobenzylmethyl paper and hybridisation with DNA probes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 1977, 74, 5350-5354,
4. **Amstrong D., Slater T.F.** (Editors) – *Free Radicals in Molecular biology, Aging and Disease.* Raven Press, New York, 1984.
5. **Arnheim N., Erlich H.** – Polymerase chain reaction strategy. *Ann. Rev. Biochem.*, 1992, 61, 131-156.
6. **Arnott S.** – Secondary structure of polynucleotides. pp. 87-104, in *"First Cleveland Symposium on Macromolecules"*. Elsevier Sci. Publ. Comp., Amsterdam, 1978.
7. **Avery O.T., MacLeod C.M., McCarthy M.** – Studies on the chemical nature of the substance inducing transformation of Pneumococcal types: Induction of transformation by desoxyribonucleic acid fraction isolated from Pneumococcus type III, *J. Exp. Med.*, 1944, 79, 137-158.
8. **Baltimore D.** – RNA-dependent DNA Polymerase in Virions of DNA Tumor-Viruses. *Nature*, 1970, 226, 1209-1211.
9. **Bailey J.E., Ollis D.F.** - *Biochemical Engineering Foundamentals*, McGraw Hill, New York, 1997
10. **Beadle G.W., Tatum E.L.** – Genetic control of biochemical reactions in Neurospora. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1941, 27, 499-503.
11. **Benga G.** (Editor) – *Structure and Properties of Cell Membrane.* Vol. 1-3. CRC Press, Boca Raton, 1985.
12. **Benson P. F., Fensom A.H.** – *Genetic Biochimical Disorders*. Oxford University Press, Oxford - New York - Toronto, 1985.
13. **Bryce C.F.A.** – *The structure and function of nucleic acids*. Pub. by BASC Group, High Holborne, London, 1985.

BUCHAREST UNIVERSITY LIBRARY

14. **Cajal N.** (Editor) – *Tratat de virusologie medicală.* Vol. I, Editura Medicală, Bucureşti, 1990.
15. **Cantor C.R., Schimmel P.R.** – *Biophysical Chemistry. Part 1: The conformation of biological macromolecules*. Freeman, San Francisco, 1980.
16. **Cernescu C.** - *Virusologie medicală*, Editura Medicală, Bucureşti, 1996.
17. **Cohen G.** – *Microorganismes et Biologie Moleculaire*. Hermann Collection Methodes, Paris, 1976.
18. **Cohn W.E.** (Editor) – *Progress in Nucleic Acid Research and Molecular Biology.* Academic Press, New York, 1979.
19. **Crick F.H.C.** – Codon-anticodon pairing: the wobble hypothesis. *J. Mol. Biol.*, 1966, 19, 548-555.
20. **Crick F.H.C.** – Central Dogma in Molecular Biology. *Nature London Harvey Lect.*, 1970, 62, 79-105.
21. **Darnell J., Lodish H., Baltimore D.** – *Molecular Cell Biology*. Scientific American Books, New York, 1986.
22. **Davidson J.N.** – *The Biochemistry of the Nucleic Acids.* Academic Press, New York, 1972.
23. **Davidson V.L., Sittman D.B.** – *Biochemistry,* 3rd edition, National Medical Series, Harwal Publishing, Phyladelphia - Baltimore - Hong Kong - Münich - Sydney - Tokyo, 1994.
24. **de Duve C.** – *Blueprint for a cell: The nature and origin of life*. Neil Patterson Publ., Burlington - North Caroline, 1991.
25. **Emery A.E.H.** – *An Introduction to Recombinant DNA*. J. Wiley and Sons, Chichester - New York, 1984.
26. **Erlich H.A.** (Editor) – *PCR technology. Principles and applications for DNA amplification.* Stockton Press, New York, 1989.
27. **Feuer G., de la Iglesia F.A.** – *Molecular Biochemistry of Human Disease*, Vol. I, C.R.C. Press Inc., Boca Raton, 1985.
28. **Fiems L.O., Cottyn B.G., Demeyer D.I.** (Editors) – *Animal Biotechnology and the Quality of Meat Production.* Elsevier, Amsterdam, 1991.
29. **Freifelder D.** – *Molecular Biology*, 2nd ed., Boston, Jones and Barlett, 1987.
30. **Gârban Z., Aumüller Corina, Daranyi Gabriela, Riviş I., Precob V.** – Implications of the chronobiochemistry-metabolism relationship in the induction of homeostasis changes. IV. The action of Cu^{2+} and Mn^{2+} on the hepatic DNA biosynthesis and on serum proteins. *"Proceedings of the 8th International Symposium on Trace Elements in Man and Animals"*. pp. 164-167, Dresden - Germany, May 16-21, 1993 (Anke M., Meissner D., Mills C.F. - Editors), Verlag Media Touristik, Gersdorf, 1993.
31. **Gârban Z.** – *Noţiuni de biologie moleculară*, Vol. II, ed. 1-a, Editura Eurobit Timişoara, 1994.

32. **Gârban Z.** – *Biologie moleculară: probleme fundamentale şi aplicative*, ed. 3-a, Editura Eurobit Timişoara, 1998.
33. **Gordon A.H., Fischer I., Clausen J.** – *Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology*. Ed. North Holland Publishing Company, 1969.
34. **Gregoire P.E.** – *Biochimie pathologique*. Presses Academiques Europeennes Bruxelles - Librairie Maloine S.A., Paris, 1971.
35. **Griffiths J.F., Miller J.H., Suzuki D.T., Levontin C.R., Gelbart W.M.** – *An Introduction in Genetic Analysis*. 5th ed., Freeman Comp., New York, 1993.
36. **Grobstein C.** – The Recombinant DNA Debate. *Scientific American*, 1977, 22, 237.
37. **Grosveld F., Kollias G.** (Editors) – *Transgenic Animals*, Acad. Press, New York, 1992.
38. **Grover P. L.** (Editor) – *Chemical Carcinogens and DNA*. Vol.I-II, CRC Press Inc., Boca Raton, 1979.
39. **Grunberger D., Weinstein I. B.** – Biochemical Effects of the Modification of Nucleic Acids by Certain Polycyclic Aromatic Carcinogens. pp.105-149, in *"Progress in Nucleic Acids Research and Molecular Biology"* (Cohn W.E., Editor), Academic Press, New York, 1979.
40. **Haggis G.H., Michie D., Muir A.R., Roberts K.B., Walker P.M.B.** – *Introduction to molecular biology*. Longmans, Western Printing Services Ltd., Bristol, 1967.
41. **Halliwell B., Gutteridge J.M.C.** – *Free Radicals in Biology and Medicine*. Clarendon, Oxford, 1986.
42. **Herman D.** – *Precis d'embryologie moleculaire*. Presses Universitaires de France, Paris, 1974.
43. **Holtzman E., Novikoff A.B.** – *Cells and organelles*. 3rd ed., Holt, Rinehart and Winston, New York, 1984.
44. **Hood L.E., Wilson J.H., Wood W.B.** – *Molecular Biology of Eucariotic Cells - A Problem Approach*. W.A. Benjamin Inc., Menlo Park- London - Amsterdam - Sydney, 1975.
45. **Hoogsteen K.** – The crystal and molecular structure of hydrogen-bonded complex between 1-methylthymine and 9-methyladenine. *Acta Cryst.*, 1963, 16 (9), 907-916.
46. **Israil Anca-Michaela** - *Biologie moleculară: prezent şi perspective*, Editura Humanitas, Bucureşti, 2000.
47. **Jack A.** – Secondary and Tertiary Structure of Nucleic Acids. pp.211-256, in *"International Review of Biochemistry. Chemistry of Macromolecules II A"*, (Offord R.E., Editor), Vol. 24, University Park Press, Baltimore, 1979.
48. **Jacob F., Monod J.** – Genetic regulatory mechanisms in the synthesis of proteins. *J. Mol. Biol.*, 1961, 3, 318-356.
49. **Jacob F.** – *La logique du vivant: une histoire de l'hérédité*, Editions Gallimard, Paris, 1970.
50. **Jaenisch R.** – Transgenic animals. *Science*, 1988, 240, 1468.
51. **Kaplan J.C., Delpech M.** – *Biologie molécularie et medicine*. Flammarion, Paris, 1990.

52. **Karlson P., Doenecke D., Koolman J.** - *Biochemie fur Mediziner und Naturwissen schaftlen*, 14 Auflage, G. Thieme, Stuttgart, 1994.
53. **Kruh J.** – *Biochimie - Etudes Medicales et Biologiques. Vol. 1, Biologie cellulaire et moleculaire*. Hermann, Paris, 1987.
54. **Luria S.E., Darnell J.E.** – *General Virology.* J. Wiley, New York, 1967.
55. **Luria S.E.** – *Life the unfinished experiment.* Charles Scribner's Sons, New York, 1973.
56. **Lwoff A.** – *L'ordre biologique*. Robert Laffont, Paris, 1969.
57. **Maillet M.** - *Biologie cellulaire*, 5-e edition, Ed.Masson, , Paris-Milan-Barcelona-Mexico, 1990.
58. **Mainwaring W.I.P., Paris J.H., Pickering J.D., Mann N.H.** – *Nucleic acid biochemistry and molecular biology.* Blackwell Scientific Publications, London, 1982.
59. **Maniatis T., Fritsch E.F., Sambrook J.** – *Molecular Cloning. (A Laboratory manual)*, Cold Spring Harbor Laboratory Publ., Cold Spring Harbor - New York, 1982.
60. **Maxam A.M., Gilbert W.** – A new method for sequencing DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 1977, 74, 560.
61. **Maximilian C., Ioan Doina Maria** – *Dicţionar enciclopedic de genetică*, Editura Stiinţifică şi Enciclopedică, Bucureşti, 1984.
62. **McKusick V.A.** – *Mendelian Inheritance in Man. Catalogs of Autosomal Dominant, Autosomal Recessive, and X-linked Phenotypes.* 8th ed. The Johns Hopkins University Press, Baltimore - London, 1980.
63. **Mead A.D., Pey K.N., Herrnstadt C., Marcil A.R., Smith M.L.** – An universal method for the disect cloning of PCR amplified nucleic acid, *Bio/Technology*, 1991, 9, 657-663.
64. **Mendel G.** – *Versuche über Pflanzenhybriden, Brünn: Verhandlungen der naturforschenden Vereins*, 1866. (citat de von Sengbusch P. în "Molekular und Zellbiologie", Springer Verlag, Berlin - Heidelberg - New York, 1979).
65. **Meselson M., Stahl F.W.** – The replication of DNA in Escherichia coli., *Proc. Nat. Acad. Sci.*, 1958, 44, 671-682.
66. **Micklos D.A., Freyer G.A.** – *DNA Science - A Fist Course in Recombinant Technology.* Printed by Carolina Biological Supply Company, Burlington, 1990.
67. **Nayak D.P.** (Editor) – *The Molecular Biology of Animal Viruses.* Vol. I-II, Marcel Dekker Inc., New York - Basel, 1978.
68. **Nirenbergerg M.W., Matthaei J.H.** – The dependence of cell-free protein synthesis in E. coli upon naturally occurring or synthetic polyribonucleotides. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1961, 47, 1588-1602.
69. **Oppenheimer C.** – *Handbuch der Biochemie der Menschen und der Tiere*. 2 Aufl. Jena, 1934.
70. **Popa L., Repanovici Rodica** – *Tehnologia DNA recombinant*. Editura Ştiinţifică şi Enciclopedică, Bucureşti, 1982.

71. **Popescu L.M., Ursaciuc C., Bancu A., Cialacu V.** - *Imunologie medicală*, Editura Universitară "Carol Davila" Bucureşti, 1998.
72. **Rich A., Nordheim A., Wang A.H.J.** – The chemistry and biology of left handed Z-DNA, *Ann. Rev. Biochem.*, 1984, 53, 791-846.
73. **de Robertis E.D.P., de Robertis E.M.F. Jr.** – *Cell and molecular biology*, 7th edition., W.B. Sanders Philadelphia, 1980.
74. **Sanger F.** – Nucleotide sequences in DNA. *Proc. R. Soc. Lond.* B, 1975, 191, 317-322.
75. **Sanger F., Nicklen S., Coulson A.R.** – DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 1977, 74, 5463-5467.
76. **Sanger F., Coulson A.R.** – The use of thin acrylamide gels for DNA sequencing. *FEBS Lett.*, 1978, 87, 107-111.
77. **Sanger F., Coulson A.R., Friedmann T., Air G.M., Barrell B.G., Brown N.L., Fiddes J.C., Hutchinson C.A., Slocombe P.M., Smith M.** – The nucleotide sequence of bacteriophage fX174 *J. Mol. Biol.*, 1978, 125, 225-231.
78. **Sanger F.** – Determination of nucleotide sequences in DNA, *Science*, 1981, 214, 1205-1210.
79. **Sarabhai A.S., Stretton O.W., Brenner S., Bolle A.** – Colinearity of gene with polypeptide chain, *Nature*, 1964, 201, 13-17.
80. **von Sengbusch P.** – *Molekular und Zellbiologie*. Springer Verlag, Berlin - Heidelberg - New York, 1979.
81. **Sittman D.B.** – Recombinant DNA. pp. 231-253, in *"Biochemistry"*, 3rd ed., (Davidson V.L., Sittman D.B., Editors), National Medical Series, Harwal Publishing, Phyladelphia - Baltimore - Hong Kong - Münich - Sydney - Tokyo, 1994.
82. **Sokatch J.R., Ferretti J.J.** – *Basic Bacteriology and Genetics*. Year Book Med. Publ. Inc., Chicago, 1976.
83. **Southern E.M.** – Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J. Mol. Biol.*, 1975, 98, 503-517.
84. **Stanciu Cristina Luminița, Dumitru I.F.** - Metode de marcare radioactiv-neradioactive a biomoleculelor, pp.7-26, în *"Tendințe actuale în biotehnologie"* (Editor Radu G.L.), Editura Ilex, Bucureşti, 2001.
85. **Stanier R.Y., Doudoroff M., Adelberg E.A.** – *The Microbial World*, Prentice - Hall Inc., London, 1970.
86. **Thomas C.G.A.** – *Medical Microbiology*. 4th ed., Bailliere Tindall, London, 1979.
87. **Tiollais P.A., Rambach A.** – Genie genetique ou manipulations genetiques? *La recherche*, 1977, 82 (8), 821-832.
88. **Watson J.D., Crick F.H.C.** – Molecular structure of nucleic acids. A structure for deoxyribose nucleic acid. *Nature* (London), 1953, 171 (4356), 737-738.

89. **Watson J.D., Crick F.H.C.** – Genetical implication of the structure of deoxyribonucleic acids. *Nature* (London), 1953, 171 (4361), 964-967.
90. **Watson J.D., Hopkins N.H., Roberts J.W., Seitz J.A., Weiner A.M.** – *Molecular Biology of the gene* Vol. I and II, 4th ed., Benjamin Cummings Publishing Co. Inc., Menlo Park CA 1987.
91. **Watson J.D., Gilmann M., Witkowski J., Zoller M.** – *Recombinant DNA*. Freeman and Comp., New York, 1992.
92. **Wilson K., Walker J.M.** (Editors) – *Principles and techniques of practical biochemistry*. 4th ed., Cambridge University Press, 1994.
93. **Woollam D.M.** – *Advances in Teratology*. Vol. I-V, Logos Press Ltd., London, 1972.
94. **Wu R.** – DNA sequence analysis. *Annu. Rev. Biochem.*, 1978, 47, 607.
95. **Zarnea G.** – *Tratat de microbiologie generală. Vol.III. Genetica moleculară - Ingineria genelor.* Editura Academiei R.S. România, Bucureşti, 1986.
96. **Zarnea G.** - *Tratat de microbiologie generală,* Vol. IV. *Imunobiologie*. Editura Academiei Române, Bucureşti, 1990
97. **Zetkin M., Kühtz E.H., Fichtel K.** - *Wörterbuch der Medizin*, VEB Verlag, Volk und Gesundheit, Berlin, 1968.
98. * * * - N.I.H. - *Guidelines Research Involving Recombinant DNA Molecules*. U.S. Government Printing Office, Washington (DC), 1976.

BCU IAŞI/CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

PARTEA III

APLICATII ALE BIOLOGIEI MOLECULARE

9. Aplicații în biotehnologie 391

10. Aplicații cu specific biomedical 429

11. Aplicații de interes cronobiochimic 441

12. Aplicații în studiul xenobioticelor 459

Referințe bibliografice (selective) 499

BCU IAȘI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

BCU IASI/CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

9. APLICATII ÎN BIOTEHNOLOGIE

9.1. CONSIDERAȚII GENERALE

Prezentarea domeniilor aplicative privind descoperirile din Biologia moleculară ridică dificultăti aproape insurmontabile, datorată exploziei informaționale apărută îndeosebi în ultimele trei decenii ale secolului XX.

Domeniile aplicative s-au conturat şi aprofundat cu o dinamică impresionantă, impusă adesea de necesitătile pragmatice socio-economice, dar şi de interesul ştiinţifico-tehnic al problematicii abordate.

Din aceste considerente se va încerca - în acest capitol - o expunere succintă a principalelor direcţii aplicative interesând domeniile farmaceutic, alimentar, agrobiologic. Alte aplicaţii vor fi prezentate în capitolele următoare.

9.2. SPECIFICUL DOMENIILOR APLICATIVE

Abordarea problemelor de biotehnologie implică definirea cadrului general al unui concept mai vechi, acela de **"inginerie genetică"**. Deşi pentru elucidarea cu acurateţe a acestui concept şi a domeniilor în care operează, s-au formulat diverse definiţii, acestea nu sunt unanim acceptate.

Din pleiada definiţiilor vom selecta pe acelea care circulă în literatura de specialitate de limbă română. Ingineria genetică - reprezintă totalitatea operaţiilor efectuate in vitro cu gene, cromosomi şi uneori cu celule întregi în scopul "construirii" unei structuri genetice cu proprietăţi ereditare premeditate (Popa şi Repanovici, 1982).

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Se prezintă şi o altă definiţie: Ingineria genetică - reprezintă modificarea structurii genetice a unui organism, prin introducerea de gene noi, aparţinând unor organisme din aceeaşi specie sau din specii diferite, prin inserarea de gene sintetizate artificial sau prin reorganizarea materialului genetic propriu (Maximilian şi Ioan, 1984). Un pertinent comentariu privind conceptul de inginerie a genelor -conţinând numeroase trimiteri la literatura de specialitate - poate fi consultat în volumul "Tratat de microbiologie generală - III" (Zarnea, 1986). In fine, problemele de "exegeză" se regăsesc în vasta literatură de specialitate de circulatie internaţională, care se adresează cititorului interesat.

In contextul ingineriei genetice, ca unul din procedeele curent uzitate, se înscrie şi "tehnologia DNA recombinant". Această tehnologie are la bază trasferul de fragmente de DNA cromosomal eucariotic către DNA plasmidal sau DNA bacteriofagal.

O caracteristică remarcabilă a acestei biotehnologii rezidă în faptul că în cadrul acestei biotehnologii a recombinării se realizează un "transfer interspecific" comparativ cu recombinarea clasică în care există doar "transferul intraspecific". Depăşirea barierelor de specie a creat angoasă în lumea oamenilor de ştiintă, a sociologilor, juriştilor etc. Din aceste considerente a fost constituit un Comitet de specialişti, coordonat de Berg, Comitet căruia i s-a solicitat un verdict de către Academia Naţională de Stiinţe a U.S.A. (National Academy of Science U.S.A.). Metodele de studiu în tehnologia DNA recombinant au fost patentate şi verificate pe anumite linii de bacterii nepatogene (mergându-se până la faza de clonare a genelor). In final Institutul Naţional de Sănătate - NIH (National Institute of Health) din Bethesda (U.S.A.) a stabilit condiţiile de lucru în care se pot efectua experimente cu DNA recombinant.

Această etapă fiind depăşită, după anii '75 s-au intensificat cercetările în domeniul noilor biotehnologii, acestea limitându-se doar la laboratoare specializate.

Prezentarea aplicaţiilor biotehnologice în volumul de faţă se va face cu succinte referiri la principalele domenii abordate. Intre acestea se vor discuta probleme privind: hormonii polipeptidici, interferonii, vaccinurile etc.

9.3. APLICAŢII DE INTERES FARMACEUTIC

Necesităţile de produse hormonale de uz farmaceutic au condus la obţinerea acestora ca extracte din produse animale, cu limitele condiţionate de specio-specificitate, sau ca produse de sinteză chimică organică. Preţul de cost ridicat a impus orientarea şi spre alte modalităţi de producere.

Astfel, în scopul obţinerii de medicamente chimioterapeutice din clasa hormonilor peptidici au fost perfectate metode de lucru specifice biologiei moleculare. Ddescoperirea DNA recombinant şi a tehnologiei acestuia a condus la ideea producerii de hormoni peptidici pornind de la procariote (i.e. bacterii).

In acest sens se menţionează obţinerea somatostatinei (1977), insulinei (1978), hormonului somatotrop (1979).

9.3.1. SOMATOSTATINA

Somatostatina este un hormon peptidic produs la nivelul hipotalamusului a cărui moleculă este formată din 14 aminoacizi (fig. 9-1). A fost iniţial izolată din extracte de hipotalamus la oaie (Guillemin, 1973). Ulterior a fost izolată şi din alte ţesuturi prelevate de la oaie, precum şi de la alte specii de animale.

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14

$H_3\overset{+}{N}$–Ala–Gly–Cys–Lys–Asn–Phe–Phe–Trp–Lys–Thr–Phe–Thr–Ser–Cys–COO^-

Fig. 9-1. Somatostatina - secvenţa aminoacizilor constituenţi

Somatostatina este produsă, în principal, de către hipotalamus şi are efect inhibitor asupra secreţiei hormonului somatotrop (somatotropina sau hormonul de creştere) hipofizar.

Un cuantum mai redus de somatotropină se produce şi la nivelul pancreasului. Pancreasul este o glandă cu secreţie mixtă: externă - enzime implicate în procesele de digestie; internă - hormonii produşi de celulele din insulele Langerhans. Hormonii pancreatici sunt: glucagonul - produs în celulele a; insulina - produsă în celulele b şi somatostatina - produsă în celulele d. Somatostatina pancreatică intervine în depresia uşoară a secreţiei de insulină şi glucagon (Rhoades şi Pflanzer, 1992).

Activitatea biologică a somatostatinei, studiată la mamifere, rezidă în efectul depresor (inhibitor) al biosintezei altor hormoni, e.g.somatotropină, insulină, glucagon.

Obţinerea somatostatinei prin extracţie din hipotalamus şi prin sinteza chimică organică s-au dovedit laborioase şi neeconomicoase. Având o catenă peptidică scurtă cu o secvenţă cunoscută s-a putut uşor deduce şi structura genei (cu 14 codoni specifici, corespunzător acizilor aminaţi).

In aceste condiţii a fost concepută producerea somatostatinei pornind de la gena caracteristică obţinută prin sinteză (Itakura et al., 1977). Apoi, prin mijloacele tehnologiei

DNA recombinant s-a realizat producerea somatostatinei. Pentru obţinerea DNA recombinant s-a utilizat plasmida p BR 322 i.e.: DNA plasmidal ca vehicul şi gena somatostatinei rezultată din sinteză chimică ca şi pasager (i.e. DNA pasager).

Identificarea somatostatinei produse prin tehnologia DNA recombinant s-a făcut prin metoda radioimunologică - RIA (Radioimmunoassay) una din cele mai performante metode prin acurateţea datelor (mergând până la 10^{-9} g).

Obţinerea somatostatinei a fost considerată un succes de excepţie al tehnologiei DNA recombinant, deoarece s-a "construit" DNA recombinant dintr-o genă de sinteză chimică (organică) şi o plasmidă care a făcut posibilă exprimarea informaţiei genetice într-o celulă bacteriană (Popa şi Repanovici, 1982).

9.3.2. INSULINA

Insulina - hormon peptidic hipoglicemiant - este sintetizată la nivelul pancreasului endocrin în celulele β din insulele Langerhans. Compusul cu structură chimică dicatenară - catena A cu 21 aminoacizi şi catena B cu 30 aminoacizi - legate prin punţi disulfidice (-S-S-) reprezintă forma biologic activă (fig.9-2). La catenele A şi B s-au stabilit şi aminoacizii N-terminali şi respectiv C-terminali.

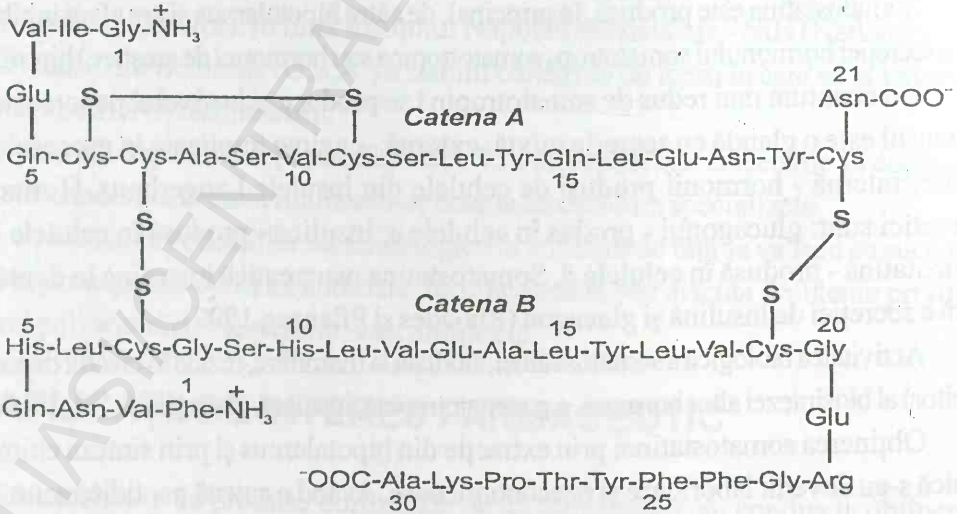


Fig.9-2. Insulina - secvenţele de aminoacizi în catenele A şi B

Secvenţa aminoacizilor din insulină a fost stabilită în 1953 de către Frederick Sanger. Această descoperire este considerată ca un moment de referinţă în biochimie, pentru

considerentul că s-a demonstrat pentru prima dată că o proteină poate fi precis definită prin secvența de aminoacizi (Stryer, 1996). De asemenea, s-a constatat că în structura acestui hormon există doar L-aminoacizi, iar legăturile peptidice (–CO-NH–) se stabilesc între grupări α-carboxilice și α-aminice.

Insulina are un precursor cu structură tricatenară (catenele A, B, C). In cursul apariției formei biologic active catena C, situată centric este "detașată" în urma acțiunii unei peptidaze.

Ca produs de uz farmaceutic insulina este folosită în tratamentul diabetului insulino-dependent (în prezent numărul acestor cazuri depășește în lume cifra de 4.000.000 persoane). Necesitatea de insulină pentru scopuri terapeutice și dificultățile ridicate de obținerea acesteia prin extracție din organe animale (pancreas bovin) sau prin sinteza chimică organică au impus tentativa de soluționare prin mijloacele tehnologiei DNA recombinant.

In acest context s-a adoptat o strategie specifică, dat fiind caracterul dicatenar al catenei biologic active. Cunoscându-se secvența aminoacizilor din catenele insulinei a fost posibilă deducerea structurii genice (în termenii biotehnologiei: "proiectarea genelor"). Apoi, s-a procedat la sinteza a două gene notate A și B corespunzător catenelor peptidice specifice insulinei. Aceste gene au fost utilizate în obținerea DNA recombinant (Crea et al., 1978).

S-au creat astfel DNA recombinant având ca vector DNA plasmidal din bacteria E. coli, iar ca pasager (i.e. DNA pasager) genele insulinei umane obținute prin sinteza chimică organică. In această situație, după clonare în celule, se obțin două molecule polipeptidice cu structuri specifice catenelor A și B. Ulterior s-a procedat la clonarea separată a catenelor și purificarea acestora in vitro.

In final, prin procedee chimice oxidative se pot forma punțile disulfidice (Goedell et al., 1979) pentru obținerea insulinei. Insulina obținută prin mijloacele tehnologiei DNA recombinant a fost numită "humulină". In această formă insulina se pretează utilizării terapeutice.

Din punctul de vedere al structurii biochimice și al mecanismului de acțiune trebuie menționat faptul că în biogeneza hormonului insulina se pornește de la *"preproinsulina"* care este formată din catenele A, B, C și o peptidă semnal N-terminală. Peptida semnal - legată de catena B se clivează prin proteoliză, rămânând un rest polipeptidic format din 84 aminoacizi (AA).

Acest rest, format din 84 AA constituie *"proinsulina"* în care au rămas: catena B - constituită din 30 aminoacizi (AA_1–AA_{30}–), catena C (intermediară) care se extinde de la restul de aminoacid 31 - până la restul de aminoacid 62 (deci –AA_{31}–AA_{62}–) și catena A terminală constituită din 21 aminoacizi care se extinde până la restul de aminoacid 84 (deci –AA_{63}–AA_{84}).

Prin detaşarea catenei C în urma unui clivaj molecular proteolitic la nivelul secvenţelor de aminoacizi Arg_{31}-Arg_{32} şi Lys_{62}-Arg_{63} - se eliberează catena A şi catena B - legate prin punţi disulfhidrice. Aceste catene constituie in facto "insulina", substanţa biologic-activă cu proprietăţi de hormon hipoglicemiant.

9.3.3. HORMONUL SOMATOTROP

Hormonul somatotrop (STH-somatotrop hormone) sau hormonul de creştere GH (growth hormone) este un compus polipeptidic format din 191 aminoacizi. Biosinteza acestuia se realizează în anterohipofiză.

Acest hormon se află la originea tulburărilor de creştere specifice perioadei juvenile, aşa numitul "nanism pituitar" sau "nanism hipofizar" (glanda hipofiză poartă numele şi de glanda pituitară). Este cunoscut, însă, şi prin efectele anabolizante.

In fiziologie se estimează că structura polipeptidică a hormonului de creştere uman (hGH - human growth hormone) prezintă similitudini remarcabile în raport cu hormonul somatomamotrop carionic uman (hCS - human chorionic somatomammotropine). Aceşti hormoni - i.e. hGH, hCS - alături de prolectină prezintă efecte fiziologice asemănătoare şi constituie un grup de hormoni denumiţi "hormoni somatomamotropi" (Rhoades şi Pflanzer, 1992).

Hormonul somatotrop hipofizar (i.e. hormonul de creştere GH) are o înaltă specio-specificitate, iar cuantumul acestuia este extrem de redus (4-6 mg în întreaga hipofiză umană). Pentru uz terapeutic la copiii cu nanism pituitar singura sursă naturală a fost hipofiza umană. Extragerea, dincolo de dificultăţile economice, prezintă riscul contaminării cu virusuri neurotrope.

Din aceste cauze pentru obţinerea hormonului somatotrop s-a preferat utilizarea tehnologiei DNA recombinant. In acest scop s-a procedat la izolarea genei specifice hormonului somatotrop, proces realizat în două etape: 1) prin sinteza chimică organică a secvenţei deoxiribonucleotidice corespunzătoare aminoacizilor 1-24; 2) cu ajutorul reverstranscriptazei pornind de la mRNA din hipofiza umană - izolat din tumori hipofizare - s-a obtinut cDNA care a stat la originea secvenţei deoxiribonucleotidice corespunzatoare aminoacizilor 25-191 (individualizarea prin "clivare moleculară" înaintea codonului pentru aminoacidul 25 s-a făcut cu ajutorul restrictazei Hae III. Producerea hormonului somatotrop uman prin tehnologia DNA recombinant a fost realizată de Goeddel et al. (1979).

In fine, după izolarea DNA al genei şi DNA plasmidal din plasmida pBR322, s-a procedat la introducerea în bacteria E. coli, care a produs un hormon somatotrop. Acest nou hormon conţine excedentar un rest de metionină în regiunea N-terminală,

comparativ cu hormonul somatotrop uman, structură care nu afectează însă activitatea biologică.

Hormonul somatrop de la animale a fost testat în medicina veterinară şi zootehnie, aflându-şi eficienţinea în stimularea creşterii ponderale a animalelor de fermă. Este preferabil anabolizanţilor (de natură steroidică) incriminaţi pentru efecte malignizante, uneori îndepărtate în timp.

9.4. APLICAȚII DE INTERES ALIMENTAR

Aplicaţiile biologiei moleculare în domeniul alimentar au făcut posibilă obţinerea - prin metode specifice biotehnologiei - a unor compuşi proteici şi, în măsură mai redusă, a unor compuşi de natură glicoproteică şi lipoproteică.

Un interes aparte prezintă însă aplicaţiile pentru obţinerea de enzime cu perspectiva de utilizare în procesarea industrială a alimentelor (Banu et al., 2000, ş.a.). Se menţionează însă că enzimele înalt purificate se pretează utilizării şi sub formă de produse farmaceutice, i.e. medicamente chimioterapice pentru afecţiuni ale aparatului digestiv.

În acest volum se vor prezenta succint, cu titlu exemplificativ, câteva aplicaţii de interes alimentar, pornind de la evidenţierea enzimelor cu atribute de aditivi alimentari. În continuare se expun date asupra obţinerii enzimelor prin metode microbiologice şi metode biochimice (Zarnea et al., 1980; Souverain, 1986; Macrae et al., 1992; Ensminger et al., 1995; Banu et al., 2000) - considerate ca metode clasice şi respectiv prin metode specifice biologiei moleculare (Micklos şi Freyer, 1990; Sittman, 1994; Gârban, 1998; Moll şi Moll, 1998) - considerate ca metode moderne bazate pe tehnologia DNA recombinant. De asemenea, se expun unele date referitoare la investigaţii asupra sistemelor enzimatice in situ.

9.4.1. ENZIME CU ATRIBUTE DE ADITIVI ALIMENTARI

Problema obţinerii şi utilizării enzimelor de interes alimentar interesează deopotrivă microbiologia, biochimia şi biologia moleculară cu direcţionare spre Biotehnologia de ramură. Explicaţia acestui interes rezidă în faptul că enzimele utilizate în procesarea produselor alimentare se pot include, alături de alţi compuşi, în grupa aditivilor alimentari (v.Cap.12.2.1).

Pentru a avea o imagine asupra anvergurii ştiinţifice şi tehnologice a problemei enzimelor de interes alimentar se vor prezenta date generale privind unele aspecte referitoare la obţinerea şi utilizarea acestora. De asemenea, se vor face referiri la sursele

naturale şi sursele bazate pe manipularea genică (e.g.: strategia bazată pe tehnologia DNA recombinant) reprezintă calea de abord în obţinerea de preparate enzimatice.

9.4.1.1. Enzimele în biochimia generală

Enzimele pot fi considerate ca "biocatalizatori" ai reacţiilor metabolice "in vivo" în microorganisme, precum şi în plante, animale şi organismul omului, sau substanţe "biologic-active" care participă la anumite reacţii care au loc "in vitro" sau "in situ". În toate cazurile enzimele pot avea rolul de "efectori biochimici" - termen care defineşte rolul acestora în modificarea unei anumite substanţe chimice desemnată prin termenul generic de "substrat".

Având în vedere aceste observaţii precum şi faptul că prezentul capitol face referire explicită la aplicaţii biotehnologice de interes alimentar - deci aplicaţiile în domeniul procesării alimentelor - se impune o succintă trecere în revistă a unor probleme generale de enzimologie.

În conformitate cu Nomenclatorul enzimelor (1979) compuşii din Clasa enzimelor se grupează în şase clase, cu caracteristici structurale şi funcţionale distincte. În acest context se vor prezenta date generale referitoare la structura şi clasificarea enzimelor.

Structura enzimelor. Sub aspect structural enzimele aparţin la două categorii de compuşi:

1) *holoenzime* - enzime cu compoziţie exclusiv proteică, formate dintr-o catenă polipeptidică
2) *heteroenzime* - enzime cu compoziţie mixtă, formate din două componente: proteică – *apoenzima* şi non-proteică – *coenzima*.

Din punct de vedere al compoziţiei coenzimele pot fi incluse în trei grupe:

a) *coenzime tetrapirolice* – conţin un macrociclu asemănător hemului şi fierul în diverse strări de oxidare (Fe^{2+}, Fe^{3+}), e.g.: citocromi, catalaze, peroxidaze;
b) *coenzime vitaminice* derivate din vitamine hidrosolubile: b') cu conţinut de piridoxal-fosfat (coenzimă provenită de la vitamina B_6), e.g.: transaminazele, decarboxilazele acizilor aminaţi; b") cu conţinut de nicotinamid-adenin-dinucleotid notată NADH (coenzimă provenită de la vitamina B_3 sau nicotinamida), e.g.dehidrogenaza;
c) *coenzime metalice* - în care există un metal sau ion metalic sub formă de constituent al enzimei sau de activator enzimatic, e.g.: alcooldehidrogenaza (ADH) – necesită Zn, arginaza - necesită Mn, tirosin-hidroxilaza necesită Cu, xantinoxidaza - necesită Mo etc.

În reacţiile biocatalitce enzimele, indiferent de structura acestora (holoenzime sau heteroenzime), participă cu componenta proteică.

B.C.U. "M. EMINESCU" IAŞI

Catena polipeptidică existentă în enzimă formează, pe un anumit segment catenar aşa-numitul "*situs catalitic*" al moleculei de enzimă. La acest nivel are loc interacţia cu molecula de "*substrat*", care urmează a fi transformată în produs de reacţie. Detalii asupra acestor particularităţi structurale şi interactive sunt expuse în diverse tratate de Biochimie, Enzimologie etc. Şerban, 1980; Goodwin şi Mercer, 1983; Champe şi Harvey, 1987; Şerban şi Roşoiu, 1992).

Clase de enzime. Studiul metabolismelor şi diversitatea căilor biochimice şi a reacţiilor catalizate a impus o sistematizare şi clasificare a enzimelor.

Pentru definirea fiecărei enzime s-a procedat la desemnarea unui cod enzimatic – EC (enzyme code). Codul enzimatic defineşte în ordine: clasa, subclasa, subsubclasa şi tipul enzimei. Deci în codul enzimatic există patru cifre: e.g. EC 1.1.1.1. caracterizează enzima alcooldehidrogenază (ADH) în care EC 1 defineşte clasa de enzime.

Denumirea enzimelor, iniţial s-a făcut după "substrat" la care s-a adăugat sufixul "-ază". În prezent, această regulă persistă pentru diferite enzime, dar pentru fiecare clasă de enzime s-a introdus o denumire în funcţie de tipul de reacţie catalizată.

Clasificarea oficială a enzimelor acreditată de Uniunea Internaţională de Biochimie – I.U.B. (International Union of Biochemistry) include şase clase: 1) oxidoreductaze; 2) transferaze; 3) hidrolaze; 4) liaze; 5) izomeraze; 6) ligaze. Fiecare din clase are un cod specific notat EC 1. – EC 6.

Date sinoptice referitoare la diversele clase de enzime, redând denumirile, codurile şi specificitatea de reacţie se prezintă în tabelul 9-1.

În continuare se vor prezenta succint clasele de enzime, relevând particularităţile biocatalitice prin exemplificarea unor grupe de enzime.

EC 1. Oxidoreductaze. Constituie grupa majoră numeric de enzime care catalizează reacţiile de oxidare şi reducere. Sunt importante în procesele oxidative celulare. Majoritatea enzimelor din această clasă au o coenzimă. Unele acţionează în prezenţa oxigenului molecular. În această grupă se includ:

- *hidrolazele* – care transformă gruparea metil $-CH_3$ în $-CH_2$-OH şi metilen $-CH_2-$ în $-CH(OH)-$ (deci alcooli primari şi alcooli secundari)
- *dehidrogenazele* – care catalizează eliminarea hidrogenului din substrate oxidabile
- *citocrommonoxidazele* – au o coenzimă heminică cu un ion Fe^{2+} — Fe^{3+} (deci în două stări de oxidare), care asigură transportul de electroni

EC 2. Transferaze. Catalizează reacţiile de transfer a radicalilor. Prin astfel de reacţii este transferat un radical care este detaşat de la o moleculă şi fixat la o altă moleculă. În această clasă se includ:

- *transmetilazele* – care pot detaşa gruparea metil $-CH_3$ de la o metionină spre a o transporta şi fixa pe altă moleculă
- *transformilazele* – care operează în sensul transportării unui radical monocarbonic oxidat, e.g.: radical formil –CHO ; radical hidroximetil $-CH_2$-OH.

Tabel 9-1. Clase de enzime - denumiri, coduri, specificitate (prezentare sinoptică)

Clasa de enzime		Denumirea enzimei	Cod enzimă	Specificitatea reacţiei cetalizate (exepmlificare)
Cod	Denumire			
EC 1.	Oxidoreductaze	Alcool dehidrogenaza	EC 1.1.1.1.	Alcool + NAD → Aldehidă sau cetonă + NADH
		Glicerol dehidrogenaza	EC 1.1.1.6.	Glicerol + NAD → Dehidroxiacetonă + NADH
		Glicerol-3-fosfat dehidrogenaza (NAD^+)	EC 1.1.1.8.	Glicerol-3-fosfat + NAD^+ → Dihidroxiacetona + NADH
		Manitol dehidrogenaza (citocrom)	EC 1.1.2.2.	D-Manitol + Fericitocrom → D-Fructoza + Ferocitocrom
		Formaldehid dehidrogenaza	EC 1.2.1.1.	Formaldehida + Glutation + NAD+ → S-Formil-glutation + NADH
		Gliceraldehid-fosfat-dehidrogenaza	EC 1.2.1.12.	D-Gliceraldehid-3-fosfat + o-fosfat + NAD^+ → 3-fosfat-D-gliceroil-fosfat + NADH
		Fumarat reductaza (NADH)	EC 1.3.1.6.	Succinat + NAD+ → Fumarat + NADH
		Alanin dehidrogenaza	EC 1.4.1.1.	L-Alanin + H_2O + NAD^+ → Piruvat + NH_3 + NADH
		Glutamat dehidrogenaza	EC 1.4.1.2.	L-Glutamat + H_2O + NAD^+ → 2-oxoglutarat + NH_3 + NADH
		Glicin dehidrogenaza (citocrom)	EC 1.4.2.1.	Glicin + H_2O + 2 Fericitocrom C→ glioxilat +NH_3 + 2 Ferocitocrom C
		Nitrat reductaza	EC 1.7.99.4.	Nitrit + Acceptor → Nitrat + Acceptor redus
		Nitrat reductaza (citocrom)	EC 1.9.6.1.	Ferocitocrom + Nitrat → Fericitocrom + Nitrt
		Citocrom peroxidaza	EC 1.11.1.5.	2-Ferocitocrom C + H_2O_2 → 2-Fericitocrom C + 2 H_2O
		Catalaza	EC 1.11.1.6.	2 H_2O_2 → O_2 + 2 H_2O
		Peroxidaza	EC 1.11.1.7.	Donor + H_2O_2 → Donor oxidat + 2 H_2O
EC 2.	Transferaze	Betain-homocisteina metil-transferaza	EC 2.1.1.5.	Betaina + L-Homocisteina → Dimetil-glicina + L-Metionina
		Nicotinat metil-transferaza	EC 2.1.1.7.	S-Adenozin-L-metionina + Nicotinat → S-Adenozin-L-homocisteina + 1-Metilnicotinat
		Glicin-metil-transferaza	EC 2.1.1.20.	S-Adenozin-L-metionina + Glicina → S-Adenozin-L-homocisteina + Sarcozina
		Aminoacid-acetil-transferaza	EC 2.3.1.1.	Acetil-CoA + L-Glutamat → CoA + N-Acetil-L-Glutamat
		Maltozo-fosforilaza	EC 2.4.1.8.	Maltoz + o-Fosfat → D-Glucoza + β-D-Glucoza 1-fosfat
		Celobiozo-fosforilaza	EC 2.4.1.20.	Celobioza + o-Fosfat → α-D-Glucoza 1-fosfat + D-Glucoza
		Terpenoid-aliltransferaza	Ec 2.5.1.11.	Alilterpend difosfat (unităţi n izopren) + izopentenil-difosfat → Pirofosfat + Terpen difosfat (unităţi n+1 izopren)
		Aspartat aminotranferaza	EC 2.6.1.1.	L-Aspartat + 2-oxoglutarat → Oxalacetat + L-Glutamat

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Tabel 9-1. Clase de enzime - denumiri, coduri, specificitate (prezentare sinoptică) - continuare

EC 3.	Hidrolaze	Carboxil esteraza	EC 3.1.1.1.	Ester carboxilic + H_2O → Alcool + Anion de acid carboxilic
		Clorofilaza	EC 3.1.1.14.	Clorofila + H_2O → Fitol + Clorofilida
		Lipoprotein lipaza	EC 3.1.1.34.	Triglicerol + H_2O → Diacil glicerol + Anion de acid gras
		Acetil CoA hidrolaza	EC 3.1.2.1.	Acetil CoA + H_2O → CoA + Acetat
		Palmitoil CoA hidrolaza	EC 3.1.2.2.	Palmitoil CoA + H_2O → CoA + Palmitat
		Succinil CoA hidrolaza	EC 3.1.2.3.	Succinil CoA + H_2O → CoA + Succinat
		Arilsulfataza	EC 3.1.6.1.	Fenol sulfatat + H_2O → Fenol + Sulfat
		Quercitrinaza	EC 3.2.1.66.	Quercitrina + H_2O → Ramnoza + Quercitrin aglicon
		Dipeptidaza	EC 3.4.13.11.	Dipeptida + H_2O → 2 Aminoacid
EC 4.	Liaze	Oxaloacetat decarboxilaza	EC 4.1.1.3.	Oxaloacetat → Piruvat + CO_2
		Glutamat decarboxilaza	EC 4.1.1.15.	L-Glutamat → 4-Aminoglutarat + CO_2
		Fumarat hidrataza	EC 4.2.1.2.	L-Malat → Fumarat + H_2O
		Manonat dehidrataza	EC 4.2.1.8.	D-Manonat → 2-ceto-3-deoxi-D-gluconat + H_2O
		Etanolamina amoniuliaza	EC 4.3.1.7.	Etanolamina → Acetaldehida + NH_3
EC 5.	Izomeraze	Alanil racemaza	EC 5.1.1.1.	L-Alanina → D-Alanina
		Lisin racemaza	EC 5.1.1.5.	L-Lisina → D-Lisina
		Aldoz-1-epimeraza	EC 5.1.3.3.	α-D-Glucoza → β-D-Glucoza
		Retinal izomeraza	EC 5.2.1.3.	*trans*-Retinal → 11-*cis*-Retinal
		Oxaloacetat tautomeraza	EC 5.3.2.2.	*ceto*-Oxaloacetat → *enol*-Oxaloacetat
EC 6.	Ligaze	Tirosil-tRNA sintetaza	EC 6.1.1.1.	ATP + L-Tirosina + $tRNA^{Tyr}$ → AMP + Pirofosfat + L-Tirosil-$tRNA^{Tyr}$
		Leucil-tRNA sintetaza	EC 6.1.1.4.	ATP + L-Leucina + $tRNA^{Leu}$ → AMP + Pirofosfat + L-Leucil-$tRNA^{Leu}$
		Acetil CoA sintetaza	EC 6.2.1.1.	ATP + Acetat + CoA → AMP + Pirofosfat + Acetil CoA
		Malil CoA sintetaza	EC 6.2.1.9.	ATP + Malat + CoA → ADP + o-Fosfat + Malil CoA
		D-Alanil-Alanin sintetaza	EC 6.3.2.4.	ATP + 2 D-Alanina → ATP + o-Fosfat + D-Alanil-Alanina
		Piruvat carboxilaza	EC 6.4.1.1.	ATP + Piruvat + CO_2 + H_2O → ADP + o-Fosfat + Oxaloacetat

EC 3. Hidrolaze. Aceste enzime care catalizează ruperea unei legături cu fixarea fragmentelor (-OH şi –H) moleculei de apă. Din clasa hidrolazelor se pot cita:

- *lipazele* – care hidrolizează acilgliceroli (gliceride) cu formare de glicerol şi acizi graşi;
- *esterazele* – hidrolizează diverşi esteri cu formare de acizi şi alcooli;
- *ozidazele* – hidrolizează diverse ozide în oze. Au denumiri specifice, în funcţie de substrat iau denumirile ozelor, e.g. glucozidaze, galactozidaze. În cazul diholozidelor (dizaharidelor) enzimele se numesc, de asemenea, în funcţie de natura substratului, e.g. maltaza, lactaza, zaharaza etc.;
- *proteinaze* – enzime care hidrolizează legături peptidice (-CO-NH-) dintre doi aminoacizi se întâlnesc în literatură şi cu denumirea veche de proteaze (mai puţin adecvată denumirii compuşilor). Proteinazele sunt adesea denumite în funcţie de "situsul activ", e.g. serin-proteinaza (tripsina, chimotripsina ş.a.); cistein-proteinaza (catepsina); aspartic-proteinaza (pepsina), metalo-proteinaza (colagenaza) etc.

EC 4. Liaze. Sunt enzime care catalizează ruperea legăturilor C-C, C-N, G-O, C-S cu formarea a două substanţe. Din această clasă se citează:

- *decarboxilazele cetoacizilor* (au drept coenzimă pirofosfatul de tiamină), care catalizează reacţia:

$$R\text{-}CO\text{-}COOH \rightarrow R\text{-}CHO + CO_2$$

- *decarboxilazele aminoacizilor* (au drept coenzimă fosfatul de piridoxal), care catalizează transformarea:

$$R\text{-}CH(NH)_2\text{-}COOH \rightarrow R\text{-}CH_2\text{-}NH_2 + CO_2$$

- *aldolazele* – care catalizează ruperea unor hexoze fosfatate în două trioze fosfatate.

EC 5. Izomeraze. Sunt enzime care catalizează diverse reacţii de izomerizare. Între acestea se citează:

- *racemazele* - catalizează transformarea unui L-aminoacid într-un D-aminoacid (deci transformări între seriile L şi D), e.g.: L-alanina → D-alanina

EC 6. Ligaze. Aceste enzime catalizează condensarea a două molecule sau fixarea unei molecule la o altă moleculă, în general, prin cuplare. Astfel de reacţii se pot exemplifica în cazul enzimelor. - *aminoacil-t-RNA sintetaza* – enzimă care fixează un acid aminat pe o moleculă de tRNA (acid ribonucleic de transfer) constituind prima etapă a sintezei proteice, e.g. formarea $tRNA^{Ala}$ (acidul ribonucleic de transfer pentru alanină)

- *acetilCoA sintetaza* - catalizează condensarea acidului acetic cu coenzima A (HS - CoA):

$$CH_3\text{-}COOH + CoA\text{-}SH \rightarrow CH_3\text{-}CO\text{-}SCoA + H_2O$$

- *carboxilaza* - fixează CO_2 pe un ceto-acid:

$$CH_3\text{-}CO\text{-}COOH + CO_2 \rightarrow HOOC\text{-}CH_2\text{-}CO\text{-}OOH$$

Cu referire la ligaze se menţionează faptul că studiul acestor enzime a fost aprofundat în ultimele două decenii odată cu dezvoltarea biologiei moleculelor (Gârban, 1997) şi a biotehnologiilor moderne cu aplicaţie îndeosebi în domeniile farmaceutic şi alimentar.

Mecanismul reacţiilor enzimatice. Indiferent de apartenenţa enzimei la o clasă sau alta, se reiterează observaţia că mecanismul de reacţie, în linii mari, are caracteristici generale comune (Vasilescu, 1961; Dumitru şi Iordăchescu, 1981). În acest sens se

menţionează existenţa unei reacţii între enzimă (E) şi substrat (S) cu formarea unui complex intermediar enzimă-substrat (ES) şi în final formarea produsului de reacţie (P), urmată de eliberarea enzimei (E). Această reacţie poate fi reprezentată după cum urmează:

$$E + S \leftrightarrows ES \leftrightarrows P + E$$

În astfel de reacţii discuţia mecanismului implică abordarea aspectelor particulare: termodinamic, e.g.: evaluarea energiei de activare şi cinetic, e.g.: viteza de reacţie; ordinul de reacţie; estimarea factorilor care influenţează cinetica de reacţie (Fresht, 1985). Toate aceste aspecte interesează în cazul când se abordează probleme referitoare la rolul enzimelor şi participarea acestora la anumite reacţii metabolice (Dumitru şi Iordăchescu, 1981; Segal et al., 1987). Astfel de detalii însă nu fac obiectul prezentului volum.

9.4.1.2. Enzimele în biotehnologia alimentară

Pentru a aborda realist şi cu acurateţe problema enzimelor în calitate de "aditivi de sorginte microbiologică" în tehnologia alimentară se impune discutarea unor aspecte generale referitoare la aditivi.

În acest sens se reaminteşte faptul că în conformitate cu Directiva - Cadru 89/107/EEC pentru aditivii alimentari s-a dat următoarea definiţie: "orice substanţă care nu se consumă ca produs alimentar ca atare şi care nu este folosit ca ingredient, indiferent dacă are sau nu valoare nutritivă, dar care devine direct sau indirect un component al produselor alimentare şi/sau al produselor auxiliare, adăugarea lor având scopuri tehnologice, de fabricaţie, procesare, tratare, ambalare, transport sau stocare".

Pornind de la această definiţie, este de la sine înţeles că în clasificarea tipurilor de aditivi se includ şi produsele enzimatice - denumite uneori direct "preparate" enzimatice (Banu et al., 2000; Gârban, 2000). În realitate discutarea problemei enzimelor cu atribute de aditivi alimentari trebuie abordată în funcţie de provenienţă şi de modul de utilizare. În această abordare se disting: aditivi microbiologici enzimatici;aditivi biochimici enzimatici; aditivi de tip "preparate enzimatice".

Aditivii microbiologici enzimatici. Sub această denumire în tratatele de specialitate din domeniul tehnologiei alimentare se includ "*culturile starter*". Astfel de culturi se utilizează în procesarea industrială a alimentelor, e.g.: produse lactate, preparate de carne, băuturile alcoolice (bere, vin) etc.

Aditivii biochimici enzimatici. Sunt cunoscuţi şi sub denumirea de "biocatalizatori" sau "biocatalizatori enzimatici". Se cunoaşte faptul că în literatura de specialitate mai

veche, din domeniul biochimiei, noţiunea de biocatalizator era curent uzitată pentru vitamine, enzime şi hormoni.

Aditivii de tip "preparate enzimatice". Sunt produse a căror obţinere impune utilizarea unor metodologii mai complexe. Astfel de aditivi, cunoscuţi sub denumirea generică de "preparate enzimatice", se obţin prin metode specifice biologiei moleculare. Având în vedere importanţa acestui domeniu şi specificul modern al metodologiei bazate pe biochimie şi biologia moleculară se vor prezenta date succinte asupra preparatelor enzimatice.

În general pentru toate produsele uzitate ca aditivi există "criterii microbiologice" a căror aplicare are menirea de-a asigura calitatea. În acest scop se urmăreşte identificarea microorganismelor, în produsul final (i.e. aditivul), astfel încât să fie exclusă contaminarea biologică.

O situaţie aparte prezintă aplicarea "criteriilor microbiologice" în cazul *preparatelor enzimatice* obţinute prin manipulare genetică. Astfel de preparate enzimatice se folosesc în procesarea anumitor produse alimentare (e.g.: produse de panificaţie, sucuri, bere etc.). Cu privire la preparatele enzimatice s-au elaborat "metode de producere" şi "norme de identificare şi de puritate" cu scopul de-a face posibilă evaluarea inocuităţii unui aditiv alimentar de acest tip.

Problema este mai simplă în cazul obţinerii de *"aditivi microbiologici enzimatici"* pornind de la "culturi starter" situaţie în care se urmăresc: tipul de microorganisme, compoziţia chimică a substratului, pH-ul, temperatura, metoda de extracţie etc.

De asemenea, în cazul "*aditivilor biochimici enzimatici*" criteriile de control sunt mai simple. În astfel de cazuri se ştie că aditivii biochimici sunt obţinuţi din ţesuturi vegetale, ţesuturi animale sau microorganisme în care există procese de biosinteză cunoscute în urma cărora se produc aşa numitele "*enzime constitutive*". Compoziţia acestora este, în general, cunoscută. Concentraţia poate însă să difere, în funcţie de mediul de cultură, mai exact spus de substratul existent (conţinutul acestuia în diverşi nutrienţi şi în factori de creştere) şi de condiţiile create (temperaturî, pH, osmolalitate etc.).

În cazul obţinerii de "*preparate enzimatice*", se folosesc metode bazate pe surse transgenice în care materialul genetic este supus clonării (Kaplan şi Delpech, 1990; Sittman, 1994). În toate cazurile se impun măsuri specifice bazate pe controlul prin instituirea aplicării normelor de identitate şi de puritate pentru a garanta starea de inocuitate.

Termenii de *aditivi microbiologici* sau *culturi starter* şi respectiv de *aditivi biochimici* sau *biocatalizatori*, utilizat în literatura de specialitate din limba română de către Banu et al. (2000), vin să răspundă unui deziderat de interes lexical, dar şi tehnic. Detaliile de interes ştiinţific şi tehnologic

constituie repere de referință într-un domeniu care se află într-o continuă dezvoltare și în care există un tranzit destul de rapid de la metodele clasice la metodele moderne de obținere a acestor aditivi.

Aplicații ale biochimiei și biologiei moleculare bazate pe "strategia DNA recombinant" de la care s-a ajuns la obținerea unor *preparate enzimatice* de tipul α-amilazei și chimosinei A (v. Cap.9.4.4.).

9.4.2. OBȚINEREA DE ADITIVI MICROBIOLOGICI ENZIMATICI

În biochimia aditivilor alimentari - domeniu de interes major în nutriție și tehnologia procesării produselor alimentare în ultimele două decenii ale secolului XX au apărut numeroase publicații în care se face referire la "aditivii microbiologici" și "aditivii biochimici". Prezentul volum, având profil de "Biologie moleculară" încearcă să surpindă doar aspectele fundamentale și aplicative și corelarea acestora cu problematica din microbiologie și biochimie.

Cu referire la "aditivii microbiologici enzimatici" terminologia utilizată în acest volum, se menționează că aceștia provin direct din culturi microbiene. În literatura de specialitate din limba română s-a utilizat o terminologie care face trimitere directă la sursa aditivilor, iu.e. culturi starter (Banu et al., 2000). Într-o accepție mai largă, specifică microbiologiei, aditivii în cauză pot fi numiți "culturi starter" sau "culturi primer" în care de fapt se află anumite specii de microorganisme sau chiar anumite "sușe" care, introduse în mediul de reacție în care se află substratul vor produce enzime specifice care participă apoi la procesarea alimentelor.

În domeniul procesării industriale a alimentelor în cazul în care se utilizează "aditivi microbiologici enzimatici" aceștia trebuie să îndeplinească unele condiții speciale (Zarnea et al., 1980; Macrae et al., 1992; Moll și Moll, 1998).

1) capacitatea de-a induce procese fermentative in situ pentru cazul când produsele alimentare se pretează consumului împreună cu celulele din culturi starter, e.g.: produse lactate acide (iaurt, chefir), preparate din carne etc.

2) capacitatea de-a induce produse fermentative in situ - pentru produsele alimentare care se consumă în urma îndepărtării celulelor din culturile starter inițiale, e.g.: produse alcoolice rezultate din fermentare (berea, vinul); produse acide rezultate din fermentare (oțetul);

3) posibilitatea de creștere a cuantumului de biomasă, e.g.: drojdia de panificație, drojdia furajeră;

4) realizarea unor efecte de activare a metabolismului urmată de obţinerea de
   a) produşi principali de fermentaţie, metaboliţi de tipul: alcool etilic, polioli, acidulanţi (acid acetic, acid malic, acid citric etc.), antioxidanţi (acid ascorbic, citric etc.), vitamine (riboflavină, ciancobalamină)
   b) produşi secundari de fermentaţie, e.g.: antibiotice, bactericide etc.

În unele cazuri culturile primer (starter) în funcţie de specia de microorganisme şi de substrat pot conduce la formarea de protein-enzime care pot fi ulterior extrase. În aceste cazuri efectul este condiţionat şi de pH, temperatură, includerea unor ingrediente cu efect de stimulare a proceselor fermentative etc.

În culturile starter se utilizează concentrate de bacterii, de drojdii şi chiar de spori de mucegai. Pentru necesităţile procesării industriale "culturile starter" se pot produce şi comercializa sub diverse forme:

α) *culturi starter lichide* - în care microorganismele se află suspendate într-un mediu care conţine alcooli polihidroxilici. Raportul alcooli/microorganisme este cca 40/60. Concentratul de microorganisme este apoi refrigerat la -35°C, chiar -45°C.

β) *culturi starter congelate* - în azot lichid (la -196 °C). Concentratul de microorganisme este anticipat amestecat cu agentul crioprotector.

γ) *culturi starter liofilizate* - în cazul acestora concentratul de microorganisme se amestecă cu un suport adecvat (e.g. lactoză, zaharoză etc.)

Se precizează că în culturile starter pentru a se asigura eficienţa trebuie să existe $2,5 \cdot 10^{10}$ - $5,5 \cdot 10^{10}$ celule/g.

Astfel de culturi starter se pretează utilizării în procesarea alimentelor în diverse ramuri ale industriei de profil, cum ar fi: industria amidonului, industria laptelui, industria cărnii, industria sucurilor, panificaţie, vinificaţie etc.

9.4.3. OBŢINEREA DE ADITIVI BIOCHIMICI ENZIMATICI

Aditivii biochimci enzimatici se pot obţine din ţesuturi vegetale, ţesuturi animale sau din microoganisme (bacterii, drojdii, ciuperci).

Astfel de aditivi, având în vedere natura enzimatică, se păstrează: în stare lichidă în flacoane de sticlă etanşeizate (de culoare maro); în stare solidă supuse anticipat liofilizării; sub formă de "produse imobilizate" (se evită utilizarea termenului de "preparate" spre a nu se confunda cu preparatele enzimatice obţinute prin mijloace specifice biologiei moleculare).

În cazul produselor enzimatice imobilizate se procedează la fixarea enzimelor pe anumite "suporturi" numite adesea şi "matrice". Drept *suporturi pentru imobilizare*

se pot utiliza: *substanțe anorganice*, e.g.: silice coloidală, colină, oxizi metalici (de Al, Zr, Ti), cărbune sau chiar perle de sticlă; sau *substanțe organice*, e.g.: celuloză, agaroză, amidon, dextran, carragenan, colagen, poliacrilamidă, polistiren etc. (Banu, 2002; Jurcoane, 2000)

Metodele de fixare pe suporturi de imobilizare sunt diverse: a) prin legare - bazat pe forțe fizice (legături van der Waals, legături ionice, legături covalente); b) prin reticulare - trecere într-un suport tip rețea; c) prin recluziune - în diverse forme gel, fibre, capsule etc.

Așa cum s-a arătat sursele de "aditivi biochimici enzimatici" diferă. Astfel, există aditivi:

α) *obținuți din țesuturi vegetale*: e.g.: papaina - obținută din Caryca Papaia; ficina - obținută din Ficus comosus; bromelaina - obținută din Ananans sp. Acestea sunt enzime proteolitice utilizabile în procesarea produselor de carne;

β) *obținute din țesuturi animale*, e.g.: *chimozina* - obținută sub formă de cheag din stomacul glandular de la rumegătoare tinere (miel, ied, vițel); *pepsina* - obținută din mucoasa stomacală de la vită și de la porc. Ambele produse au specific de enzime proteolitice și se pretează folosirii în procesarea produselor lactate;

γ) *obținute din microorganisme* , e.g.: *α-amilaza* - se poate obține din bacterii: Bacillus subtilis, Bacillus licheniformis, Bacillus amylolicheficiens sau din fungi: Aspergillus oryzae ș.a.; *β-gluconază* din ciuperci - Penicillium emerson, Aspergillus niger etc.

În procesarea industrială a alimentelor "aditivii biochimici enzimatici" se utilizează în industria berii, industria amidonului etc. Evident exemplele pot continua. Acest domeniu nu face însă obiectul prezentului volum. Pentru cititorul interesat o documentare mai aprofundată se poate face în lucrări de specialitate din domeniul tehnologiilor de procesare pe diverse specialități (v.Banu et al., 2000)

9.4.4. OBȚINEREA DE PREPARATE ENZIMATICE PRIN METODE SPECIFICE BIOLOGIEI MOLECULARE

Există însă noi aspecte în cazul obținerii de "preparate enzimatice" prin metode specifice biologiei moleculare – situație în care se aplică preceptele geniului genetic, deci se recurge la tehnici de manipulare genetică (Kaplan și Delpech, 1990; Micklos și Freyer, 1990; Gârban, 1999). Astfel s-au obținut preparatele enzimatice din surse transgenice. La aceste preparate enzimatice se impune cercetarea eventualei prezențe a celulelor viabile ale organismului de origine (transgenic), a plasmidei – ca vector de expresie, a fragmentelor de DNA și a proteinelor non-enzimatice (Maximilian și Ioan, 1984).

În acest cadru se menţionează aplicarea biotehnologiei DNA recombinant în obţinerea unor preparate enzimatice de tipul α-amilazei şi chimosinei A.

α-Amilaza – derivată de la Bacillus stearothermophilus exprimată în Bacillus subtilis s-a obţinut prin "fermentare extracelulară" controlată de B. subtilis (ATCC 39705). Acesta conţine gena a- amilazei provenită de la B. stearothermophilus (ATCC 39709) care a fost inserată în plasmida pCPC 720. Obţinerea acesteia a fost apreciată ca un domeniu de interes major pentru biotehnologia DNA recombinant cu reale perspective de aplicare.

Chimosina A – se obţine pornind de la Escherichia coli K-12 modificată genetic, care reprezintă o suşe non-patogenă în care se află gena prochimozinei A. Pentru fragmentul de DNA din Escherichia coli, suşa K-12 s-a folosit o plasmidă de exprimare (pPFZ87A) Aceasta a fost obţinută din plasmida pBR322 - un vector de clonare larg utilizat în biologia moleculară.

Cu privire la "preparatele enzimatice" care urmează a se folosi ca aditivi alimentari specifici unor metode de procesare din industria fermentativă, în prezent se intreprind numeroase studii. Obiectivele acestora vizează: utilizarea unor metode de modificare genetică specifice enzimologiei; caracterizarea organismelor producătoare; procedeele de fermentare; aspectele toxicologice etc. Numeroase studii sunt destinate perfectării mijloacelor de obţinere a preparatelor enzimatice liofilizate.

Obţinerea preparatelor enzimatice, în fapt obţinerea de "proteino-enzime", prin metode specifice biologiei moleculare se bazează pe "strategia DNA recombinant" (v.Cap.6). În continuare se urmăreşte clonarea DNA recombinant.

Conceptul de clonă, în sensul biologic (clasic) al noţiunii se referă la celule cu genotip identic.În această accepţie există, în biologia celulară, denumirea de "clonă celulară "a unui anumit ideotip.

În biologia moleculară, în contextul referitor la DNA recombinant, conceptul de clonă se referă în mod specific la celule –gazdă identice, care sunt purtătoare ale unor molecule identice de DNA recombinant (Davidson şi Sittman, 1994).

Principiile de bază privind clonarea sunt în esenţă, aceleaşi indiferent de DNA-vector, de DNA-pasager (i.e.: DNA-ţintă) şi de celula-gazdă.

În general se poate afirma că există o strategie a clonării care poate fi etapizată.În cadrul strategiei clonării se poate remarca existenţa unor etape distincte:

a) formarea moleculelor de DNA recombinant-care constituie primul pas al clonării. Molecula recombinantă se va "insera" şi "clona" într-o celulă-gazdă specifică.

b) Inserarea şi propagarea DNA recombinant în celule gazdă-reprezintă o secundă etapă. Procedeele perfectate în biologia moleculară au permis "inserarea" DNA în aproape toate tipurile de celule bacteriene, chiar în celulele vegetale şi animale.

c) Selectarea transformanților sau a transfectanților-constituie ultima etapă care se poate realiza la două niveluri:

α) primul nivel - asigură transfectarea tuturor celulelor care nu sunt transformate sau transfectate;

β) secundul nivel - permite selectarea doar pentru celulele care au preluat DNA recombinant conținând un DNA țintă specific.

Datele prezentate cu referire la mijloacele operatoare ca și la strategia necesară în biotehnologia DNA recombinant oferă un cadru de înțelegere a specificului metodologic, a acurateței dar și a biohazardului la care pot conduce posibile inadvertențe documentare (literatură, aparatură) și rareori experimentale.

Aplicațiile de interes alimentar sunt orientate spre biologia moleculară a acizilor nucleici și a proteinelor. Predilect interează biochimia și biologia moleculară a proteinelor cu rol de enzime, domeniu care face trimitere la biotehnologii.

Este remarcabil – în domeniul biotehnologiilor – programul BIOTOL, având ca fondator COMETT (The European Community Action Programme for Education and Training for Technology) care a stat la baza elaborării unei serii de cărți publicate cu privire la: managementul genomului (pro- și eucariotic); culturile in vitro pentru microorganisme și pentru celule (vegetale și animale); designul bioreactoarelor; energetica celulară; analiza bioproduselor; tehnologii de bioprocesare etc. (James et al., 1992).

9.4.5. INVESTIGAȚII ASUPRA UNOR SISTEME ENZIMATICE IN SITU

Problema aplicațiilor de interes nutrițional ale biologiei moleculare nu se opresc doar la enzime cu atribute de aditivi alimentari necesare procesării industriale a alimentelor.

În acest context se menționează și existența unor studii de enzimologie care sunt orientate spre probleme referitoare la procesul de simbioză în relația procariote-eucariote. Astfel de studii, spre exemplu,au permis evaluarea rolului enzimelor în fixarea azotului implicat în sinteza proteică (Goodwin și Mercer, 1983; Walker, 1992).

În prezent una din direcțiile importante privitoare la investigarea sistemelor enzimatice este orientată spre elucidarea particularităților biosintezei constituenților de interes nutrițional din plante. În acest cadru se înscrie investigarea rolului nitrogenazelor în fixarea azotului atmosferic în plante. Fixarea azotului este importantă prin efectele asupra anabolismului proteinelor în regnul vegetal (Constantinescu și Hațieganu, 1983; Micklos și Freyer, 1990; Celis, 1994).

Fixarea azotului atmosferic în plantele de cultură – de interes alimentar – prezintă importanţă sub raport biologic şi economic. Se cunoaşte faptul că anumite bacterii din genul Azobacter, Rhizobium, Klebsiella ş.a. pot constitui simbionţi pentru anumite plante de cultură. Astfel de simbionţi de tipul procariot-eucariot pot contribui la fixarea de azot în plante, predilect în leguminoase, e.g.: mazăre, fasole ş.a

In genomul acestor bacterii există gene *nif* (nitrogen fixation) care au capacitatea de-a fixa azotul molecular atmosferic pe care-l transformă în compuşi organici. Genele *nif* asigură codificarea "sistemului enzimatic al nitrogenazelor", intervenind astfel în sinteza proteică. Stimularea sintezei prin simbionţi poate conduce la reducerea consumului de îngrăşăminte cu azot având două consecinţe concrete: reducerea cheltuielilor de producţie şi protecţia mediului ambiant, faţă de efectele negative ale îngrăşămintelor.

Sistemul enzimatic al nitrogenazelor este constituit din metaloproteide în care sunt prezente microbioelemente metalice. Nitrogenazele izolate din diverse surse vegetale prezintă similitudini ale relaţiei structură chimică-activitate biologică.

In principiu, sistemul enzimatic al nitrogenazelor este constituit din două specii moleculare, e.g.: 1) *molibdofer-redoxina* - care conţine o componentă proteidică tetrameră cu masa de 250.000 Da, şi o componentă prostetică formată din ioni de Mo şi Fe; 2) *azofer-redoxina* - cu o componentă proteidică dimeră cu masa de 60.000 Da şi o componentă prostetică reprezentată de ioni de Fe. Sistemul enzimatic nitrogenazic este biologic-activ când există ambele specii moleculare.

Pentru autoprotejarea "sistemului enzimatic nitrogenazic" bacteriile fixatoare de azot dispun de anumite bariere morfofuncţionale de excludere a oxigenului liber. Mecanismele biochimice caracteristice acestei autoprotejări nu sunt cunoscute.

Prin tehnologia DNA recombinant, aplicată în domeniul biologiei moleculare vegetale, este posibilă obţinerea unor proteine de interes alimentar în cadrul unor procese de biosinteză care au loc în cereale şi leguminoase.

In general se poate afirma că progresele realizate în investigaţiile asupra plantelor întâmpină dificultăţi datorită particularităţilor morfologice şi topobiochimice ale membranei celulare (Micklos şi Freyer, 1990). Investigaţiile privind aplicaţiile biologiei moleculare vegetale evaluarea implicaţiilor în producerea proteinelor de interes alimentar cunosc în prezent o continuă extindere.

Utilizând metodele specifice biologiei moleculare s-a demonstrat posibilitatea transferului genelor *nif* de la Klebsiella pneumoniae la Escherichia coli prin transducţie cu fagul P1 (Steicher et al., 1978 - citat de Zarnea, 1986).

De asemenea, utilizând metodele biologiei moleculare în cadrul experimentelor de inginerie genetică s-au obținut tulpini de bacterii hiperfixatoare de azot (Popa și Repanovici, 1982). Investigații în acest sens, au fost efectuate pe bacterii din genul Azospirillum, aflate la rădăcinile unor plante cerealiere (e.g. grâu , porumb). Fixarea de azot la nivel radicular se corelează cu sinteza de proteine vegetale.

9.5. APLICATII CU REFERIRE LA ANIMALE

In cadrul aplicațiilor biologiei moleculare întreprinse pe animale se menționează experimentele cu privire la obținerea de *"animale transgenice"*. Astfel de experiențe au fost efectuate inițial pe animale de laborator, ulterior fiind extinse pe animale domestice.

Conceptul de animale transgenice definește animalele rezultate dintr-o ovocită fecundată, în care s-a transferat o secvență de DNA genic exogen, încorporată ulterior genomului propriu. Secvența de DNA exogen (i.e. transgena) reprezintă gena străină care se inserează la DNA din ovocită.

Studiul animalelor transgenice, pornind de la ovocita fecundată, reprezintă o modalitate de-a aborda problema mecanismelor de expresie ale genelor eucariotice direct in vivo. Este o modalitate superioară de investigare comparativ cu metoda clasică în care studiul se efectua în culturi de celule – in vitro. Dacă principiile metodologice sunt relativ simple, fezabilitatea implică respectare unui anumit protocol operațional etapizat.

Problema transgenezei bazată pe tehnici de microinjectare (e.g. în ovocita fecundată), presupune o anumită *strategie* a utilizării și se realizează pe baza unor *protocoale* riguroase prezentate în manuale de profil, ghiduri de laborator etc. Aplicațiile cuprind arii de cercetare de interes biologic și biotehnologic. Domenii cu topică majoră pot fi considerate: producerea șoarecelui transgenic; recombinarea specifică în celulele embrionare; studiul morulei ș.a. (Grosveld și Kollias, 1992)

In studiile asupra transgenității există protocoale experimentale riguros elaborate pentru *animale de laborator* și pentru *animale domestice*.

Metodologia experimentală are caracterul unei manipulări genetice, a unui organism pluricelular, practicată in vivo. La *animalele de laborator* - spre exemplu la șoarece - un protocol experimental se prezintă astfel:

a) prelevarea ovulelor fertilizate – din oviductul femelei de șoarece – la 12 ore după împerechiere. In această perioadă "embrionii" prelevați se află în stadiul unicelular, înainte de fuzionare (i.e. amfimixia) pronucleilor mascul și femel;

b) microinjectarea DNA exogen – în cantitate de câţiva pL (picolitri) - într-un pronucleu, cu ajutorul unei micropipete capilare (efilate), folosind şi o pipetă de contenţie pentru ovocită (fig. 9-3).

c) reimplantarea chirurgicală a embrionilor (la care s-a practicat microinjectarea) în oviductul unei femele de şoarece considerată "pseudo-gestantă". O astfel de femelă, numită şi "femelă- receptoare" a fost împerecheată (în prealabil) cu un mascul vasectomizat.

Vasectomia masculilor se practică prin diverse metode chirurgicale. In vasectomie se menţine statusul endocrin al androgenilor, dar se exclude posibilitatea eliminării spermatozoizilor (Gârban, 1967; Pintea şi Gârban, 1979).

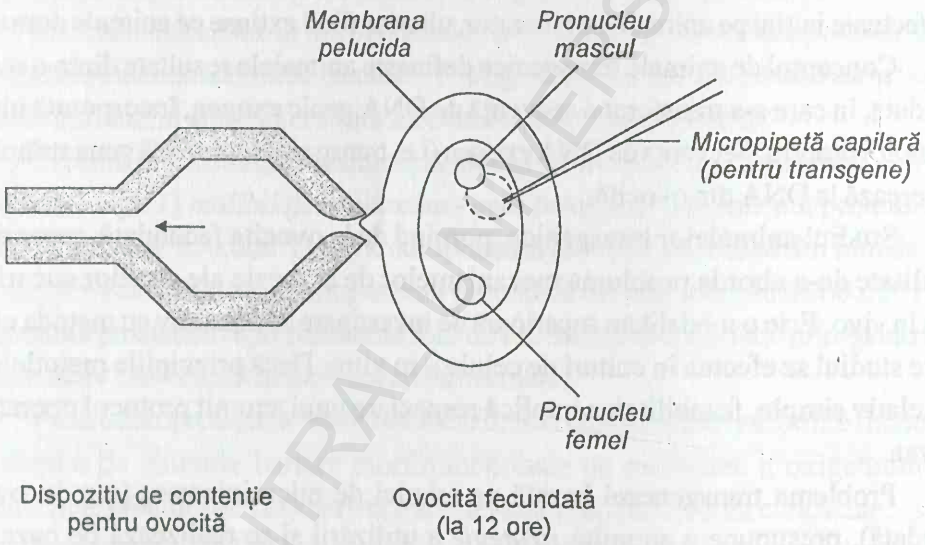


Fig. 9-3. Procedura de microinjectare în studiul transgenităţii la animale (detalii în text)

d) evaluarea - post partum – a efectelor microinjectării de transgene. In acest sens sub raport statistic, la şoareci se menţionează că din 100 embrioni supuşi microinjectării, supravieţuiesc aproximativ 70 şi aproximativ 20 ajung la termen (i.e. data parturiţiei).

e) examinarea nou născuţilor obţinuţi de la "femele-receptoare" şi investigarea prezenţei transgenelor în DNA genomic la aceşti descendenţi. In cazul acestora se estimează că din 100 de embrioni microinjectaţi iniţial, aproximativ 5 încorporează transgena. După diverse statistici procentele sunt de 5%, 10% şi maximum 20%.

BCU "LUCIAN BLAGA" CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

In general, se apreciază că la produşii de concepţie nou născuţi secvenţele de DNA exogen (transgenele) s-au integrat – adesea la hazard – în genomul proriu. In această manieră se obţin şoarecii transgenici, în al căror genom există transgenele. Copiile integrate se regăsesc în toate celulele şi pot fi transmise la descendenţi (Grosveld şi Kollias, 1992).

După cum s-a văzut numărul copiilor integrate este inconstant, fiind în mare măsură dependent de gena microinjectată. In acest sens există observaţii interesante privind topica şi reglarea genelor integrate. In anumite cazuri (e.g.: genele metalotioneinei, transferinei, elastazei), expresia genei integrate este topică – fiind specifică unui ţesut (unei anumite interacţii biochimice) şi este reglată. In alte cazuri expresia genei integrate este ectopică şi non-reglabilă, e.g.: gena globinei la care s-a observat o expresie musculară la şoarecele transgenic.

Un exemplu spectaculos în studiul transgenităţii la animale este oferit de utilizarea hormonului de creştere – GH (growth hormone). Gena acestui hormon provenind de la şobolan, este cuplată cu un promotor de metalotioneină la şoarece. Cuantumul hormonului de creştere (somatotrop) în organismul şoarecilor din grupul de experienţă creşte de cca 800 de ori, comparativ cu şoarecii din grupul de control (martor). Şoarecii la care s-a practicat acest transfer genic aveau talia apropiată de a şobolanilor, reuşind să confirme şi fenotipic intervenţia în genomul nativ (Palmiter et al., 1982).

Promotorul metalotioneinei a direcţionat expresia hormonului de creştere mai mult spre ficat decât spre glanda hipofiză, care este locul biosintezei acestui hormon. Eliberat de sub controlul hipotalamusului hormonul de creştere a fost sintetizat în cantităţi mai mari. Acest fapt poate explica de ce "şoarecii transgenici" cresc de două ori mai mari decât exemplarele normale. S-a observat însă că la aceste animale apar numeroase probleme de sănătate, e.g.: femelele sunt deseori sterile, apar afecţiuni renale, tulburări locomotorii, durata vieţii este mai scăzută.

Pentru obţinerea animalelor transgenice s-a utilizat şi o altă metodă bazată pe culturile de linii celulare embrionare. Blastocitele exsitente în astfel de culturi au fost folosite ca "sisteme ţintă" pentru transferul de secvenţe de DNA genice. In aceste condiţii "injectarea" secvenţelor de DNA s-a făcut în balstociste, iar genele s-au transmis generaţiilor următoare. Prin selecţie se pot obţine linii de animale transgenice pure.

Se remarcă faptul că animalele transgenice (e.g. şoareci) se pretează utilizării în experimente privind bolile genetice umane, studiul sistemului imun ş.a.

Studiile privind transgenitatea au fost extinse de la animale de laborator la *animale domestice*, urmărind varii aspecte de biologie moleculară, biochimie – metabolism, patologie medicală veterinară, dar şi de zooeconomie.

In condiţii experimentale, prin studii efectuate pe porcine s-au obţinut porci transgenici care produc o carne mai slabă cu grăsime mai puţină şi necesită un consum de alimente mai scăzut cu cca 20-30%. La aceste animale s-a observat susceptibilitate la stress, tulburări locomotorii (artrite), tulburări ale funcţiei de reproducere.

La bovine s-a studiat efectul experimental produs de *"somatotropina bovină"* clonată în perioada 1970 în bacteria E.coli. Experimental s-a observat că aceast hormon stimulează creşterea precum şi dezvoltarea sistemelor muscular şi osteo-articular, intervenind în metabolismele glucidic şi lipidic. Injectarea somatotropinei bovine a permis creşterea producţiei de lapte cu 10-25%, dar şi în acest caz s-au observat: susceptibilitate crescută la infecţii, frecvente tulburări de reproducţie.

La ovine s-a urmărit influenţarea creşterii lânii, care este dependentă – sub raport biochimic – de cuantumul cistinei. S-a observat că în cazul unor enzimopatii, la ovine are loc o limitare a creşterii lânii. Cu ajutorul biologiei moleculare s-a procedat la clonarea a două gene bacteriene codificatoare pentru enzimele bacteriene care convertesc serina în cisteină. Obţinerea unor *oi transgenice*, în genomul cărora apăreau aceste gene, a evidenţiat o activare a sintezei de cisteină proprie, asigurându-se astfel o creştere a producţiei de lână.

In general în literatura de specialitate referitoare la transferul genic la animale domestice se subliniază faptul că expresia unei gene străine este puţin probabil să furnizeze un simplu mijloc de îmbunătăţire a productivităţii animalelor. Rolul preponderent în creşterea productivităţii este atribuit nutriţiei animalelor prin care este posibilă realizarea potenţialului genetic existent. Această observaţie nu micşorează însă importanţa studiilor asupra transgenităţii la animale.

9.6. APLICATII CU REFERIRE LA PLANTE

Aplicaţiile biologiei moleculare şi biochimiei acizilor nucleici asupra plantelor au progresat mai lent. Acest fapt se datorează, în parte, priorităţilor de cercetare şi alocare de fonduri. In mare măsură, însă, se datorează caracteristicilor derivate din specificul biologiei moleculare vegetale şi al topobiochimiei celulare la plante. In acest sens se evidenţiază următoarele caracteristici:

- creşterea mai lentă a plantelor, estimată prin durata de timp de la o generaţie la alta;
- prezenţa a numeroşi cromosomi poliploizi (fapt specific geneticii vegetale), care împietează studiul riguros al DNA cromosomial;
- existenţa unui genom impresionant de mare la unele plante, e.g.: genomul haploid al grâului ($10 \cdot 10^9$ pb) depăşeşte de cca cinci ori, ca mărime, genomul uman;

- existența unui perete celular cu conținut ridicat în poliglucide, care circumscrie membrana celulară vegetală și conferă rezistență celulei (implicit rezistența la introducerea DNA exogen, interesând problema plantelor transgenice).

Studiile moderne cu referire la "știința despre plante" (spre a folosi o expresie acreditată în prezent) au impus integrarea biochimiei vegetale și biologiei moleculare în uzul curent al laboratoarelor de cercetare (Constantinescu și Hațieganu, 1983; Micklos și Freyer, 1990). Prin aceasta se urmăresc progrese continue în biotehnologia și genetica moleculară vegetală. Se consideră însă că progresele sunt dependente de abilitatea de creare și/sau implementare a noilor metode de cercetare specifice biologiei moleculare.

In studiile aplicative privind "*transgenicitatea la plante*", dependent de speciile de plante care fac obiectul cercetărilor, se aplică mai multe metode:

a) microinjectarea prezentând similitudini cu procedeul din biologia moleculară animală, după care se "introduce" DNA transgenic;
b) electroporația – bazată pe utilizarea unui curent de înalt voltaj;
c) chemoporația constând în bombardamentul cu particule – sub forma unor pellets-uri – în care se află DNA exogen.

În domeniul biologiei moleculare vegetale problema plasmidelor a fost studiată la Agrobacterium tumefaciens care poate produce creșterea tumroală la plante. S-a observat că această bacterie tranzitează peretele celular vegetal după leziuni prin abraziune (i.e. leziuni mecanice). Celula vegetală integrează un fragment din DNA plasmidal de la Agrobacterium. De remarcat faptul că DNA plasmidal funcționează ca DNA vector în celula-gazdă vegetală.

In celulele-gazdă care au inclus DNA plasmidal, numite adesea și "celule transformate", se produce o perturbare a metabolismului protidic caracterizată prin sinteza unui aminoacid derivat al argininei, numit *"opina"*. Acest compus este incriminat pentru procesele proliferative induse în țesuturile vegetale afectate. In aceste țesuturi se produce o proliferare cu formarea unei tumori gigante. Plasmidul care se află la originea acestor procese este denumit plasmid inducător de tumoare – T_i (tumor-inducing).

In plasmidul T_i (i.e. DNA plasmidal T_i) există o regiune, notată uzual prin T-DNA, în care sunt înmagazinate gene specifice pentru codarea biosintezei de opină. De asemenea există gene vir care codează biosinteza enzimelor necesare pentru excizia plasmidei și integrarea la nivelul T-DNA a unui fragment de DNA cromosomal al celulei-gazdă. După aceasta se formează DNA recombinant (fig. 9-4). Pentru a obține vectorul reprezentat prin "DNA plasmidal T_i" este necesară excizia regiunii T-DNA implicată în biosinteza de opină.

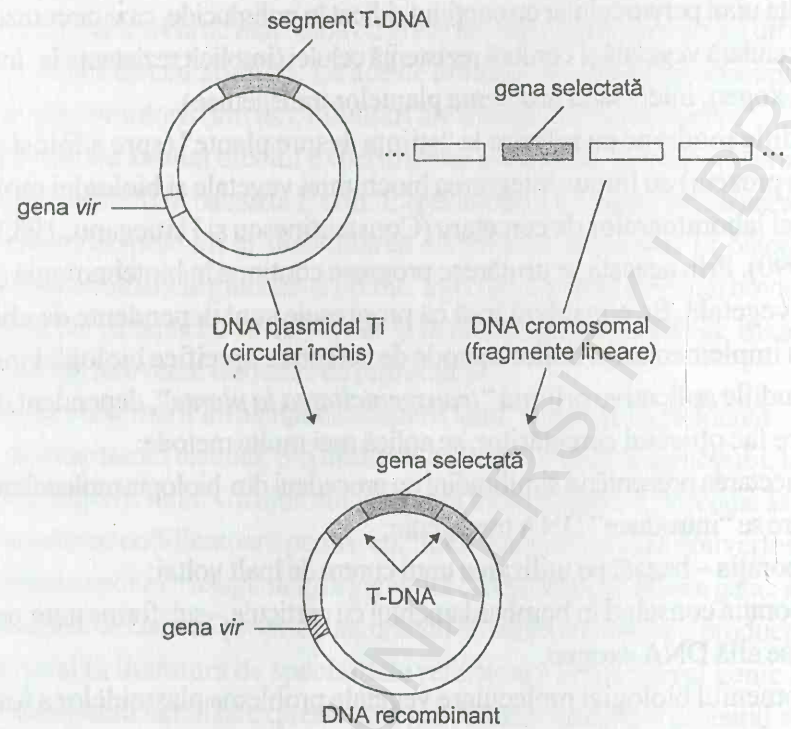


Fig. 9-4. Formarea DNA recombinant la plante (detalii în text)

Pentru clonare DNA plasmidal T_i integrează un fragment din DNA cromosomal al genei ţintă din celula vegetală. Pentru clonare s-au folosit culturi de celule vegetale în care s-au obţinut creşteri nediferenţiate sub formă de "calus". De asemenea, studiul efectelor asupra culturilor de ţesuturi, în care s-au aflat resturi de frunze, a evidenţiat, după clonare, regenerarea ţesuturilor vegetale.

Manipularea genică descrisă mai sus s-a dovedit posibilă doar la plantele care sunt susceptibile la infectare cu Agrobacterium. Studiile în această direcţie urmăresc extinderea tipurilor de celulă-gazdă la unele plante monocotiledonate de interes agricol.

In biologia moleculară vegetală aria problematicii interesează,de asemenea, protecţia plantelor existând patru direcţii prioritare: a) rezistenţa la virusuri; b) rezistenţa la pesticide; c)rezistenţa la ierbicide; d) rezistenţa la stresul termic.

A. Rezistenţa la virusuri

A fost studiată pornind de la similitudinile existente cu imunizarea la animale. Astfel s-a procedat la "inocularea", în plante, a unor specii benigne de virusuri cu scopul

de a obține *"protecția de încrucișare"* (engl. cross-protection). Aceasta a avut drept scop reducerea pierderilor de recolte cauzate de infecții virale. Astfel de studii au fost efectuate asupra tomatelor, cartofilor, citricelor.

S-a obervat că în cazul "protecției încrucișate" infecția produsă de virusul inoculat (i.e. infecția primară) suprimă sau întârzie începutul simptomelor cauzate de suprainfectarea cu un al doilea virus (i.e. infecția secundară). Mecanismul molecular, vizând aspectele biologice ale protecției încrucișate nu este elucidat

Problema "protecției încrucișate" a fost studiată asupra virusului mozaicului tutunului (VMT) folosind plasmidul T_i de la Agrobacterium (Beachy et al., 1986). S-au obținut astfel *plante transgenice* de tutun în care exista plasmidul T_i în DNA recombinant care exprima "gena proteinei de înveliș" a VMT.

Această genă prin clonare s-a integrat stabil în genomul plantelor transformate și a fost transmisă ereditar la descendenți. S-a observat că la plantele transgenice rezistența la virusuri - mediată prin gena proteinei de înveliș a VMT – a redus frecvența infecției și a limitat răspândirea locală și sistemică a infecției.

B. Rezistența la pesticide

A reprezentat o altă direcție de cercetare a biologiei moleculare vegetale. Teoretic s-a supozat că acest tip de rezistență ar putea să-și aibe originea în "gene solitare".

Experimental a fost cercetată gena endotoxinei produse de Bacillus thuringiensis (Bt). Această endotoxină este considerată a fi un insecticid non-contaminant al mediului. Eficiența endotoxinei s-a dovedit în distrugerea unui procent mare de omizi.
Gena selectată a endotoxinei Bt a fost exprimată ca transgenă în plantele de tutun și tomate la care a fost mai facilă integrarea în genom.

C. Rezistența la ierbicide

A fost studiată la plante de cultură. In astfel de situații se urmărește identificarea și transferul genelor care asigură o astfel de rezistență. Ierbicidele – în general – afectează enzimele unor căi metabolice esențiale pentru plante, e.g. fotosinteza, biosinteza acizilor aminați etc.

Genele de rezistență trebuie să asigure funcționalitatea proceselor metabolice la plantele de cultură în raport cu buruienile (în cazul unui ierbicid non-selectiv).

D. Rezistența la stresul hidric

Este orientată spre selectarea genelor care pot asigura toleranța la excesul de compuși minerali (e.g. clorură de sodiu, clorură de potasiu, fosfați) în cursul perioadelor de secetă.

BCU "MIHAIL EMINESCU" LIBRARY

9.7. APLICAŢII DE INTERES AGROBIOLOGIC

9.7.1. PRIVIRE SINOPTICĂ

Aplicaţiile de interes agrobiologic discutate în acest capitol se corelează cu problema organismelor modificate genetic (OMG) şi utilizarea acestora în alimentaţie.

În agrobiologie aplicaţiile biologiei moleculare se bazează pe preceptele *"ingineriei genetice"*. Aşa cum s-a arătat "ingineria genetică se prezintă ca un ansamblu de metode şi tehnici de manipulare a informaţiei genetice la nivel molecular şi celular, se pretează pentru obţinerea de genotipuri noi, i.e. organisme « reprogramate genetic » importante pentru lucrările de ameliorare (la plante şi animale)..." (v. Cap. 8.1.). În accepţia terminologiei utilizate din acest volum se uzitează conceptul de « recombinare mediată biotehnologic ».

Pentru aplicaţiile de interes agrobiologic se procedează la implementarea metodologiilor specifice biologiei moleculare, mai precis a tehnologiei DNA recombinant în biotehnologiile moderne în agricultură şi zoocultură (Griffith et al., 2000; Cockburn, 2002; Faust şi Glenn, 2002).

Graţie metodelor uzitate în ingineria genetică a devenit posibilă intervenţia în "patrimoniul genetic" al celulelor vegetale şi animale (Kendrew, 1994; Koldziejczyk, 1998; Griffiths et al., 2000).

Intervenţia în genomul unei celule eucariote (vegetale sau animale) se realizează, în principiu, pe două căi: a) introducerea în celulă a uneia sau mai multor gene noi numite "*gene de interes*"; b) modificarea expresiei uneia sau mai multor gene existente în celulă.

Operarea pe aceste căi implică transferul de gene. Genele transferate prin mijloace specifice ingineriei genetice sunt cunoscute sub denumirea generică de "*transgene*".

Rezultatul aplicării metodelor de manipulare genetică rezidă în inducerea unei schimbări produse în genom, denumită *"transformare genetică"* sau *"modificare genetică"*.

În urma modificării genomului celular prin introducerea unei (unor) gene care provine (provin) de la alt(e) organism(e) se produce aşa numitul *"transfer de gene"* sau *"transgeneza"*.

Conceptul de transgeneză, defineşte modificarea unui genom celular ca o consecinţă a translocării de gene provenite de la alt organism. Transgeneza (i.e. transferul de gene) în principiu, se poate efectua în cadrul speciei - *transfer intraspecific*, sau între diverse specii - *transfer interspecific*.

În cazul transgenezei se urmăreşte iniţial reperarea şi caracterizarea unei anumite gene care interesează un anumit caracter. Această,aşa numită, "genă de interes", face obiectul transferului de la un organism la altul. Se menţionează faptul că "gena de interes" caracterizează genotipic un anumit fenotip (un anumit caracter morfologic, fiziologic, comportamental).

9.7.2. TRANSGENEZA: DE LA CONCEPT LA APLICAȚII

Intervențiile realizate în genom – așa cum s-a relevat – reprezintă de fapt expresii ale recombinării genice mediate biotehnologic (v. Cap. 8.1.) Detaliile asupra acestora sunt relevate prin mijloacele de operare specifice pentru strategia obținerii DNA recombinant.

Evident modificările induse la nivelul genotipului se vor evidenția în cadrul fenotipului. Astfel, prin transgeneză se obțin modificări ale genomului – bazate pe mijloace specifice ingineriei genetice – rezultând în final *"organisme modificate genetic"* (OMG) sau *"organisme transgenice"* (Kendrew, 1994; Griffiths et al., 2000).

9.7.2.1. Metode de transfer a genelor

Transferul de gene (i.e. transgeneza) se realizează prin diverse metode: a) transfecția; b) biobalistica; c) electroporația; d) microinjectarea; c) chemoporația.

Transfecția. Metoda de bază a transfecției folosește Agrobacterium tumefaciens care conține o plasmidă Ti și permite integrarea parțială în celulele plantei. Noua genă va fi încorporată în genomul celular al plantei. Această bacterie este ineficientă la porumb, grâu și orez. Din acest considerent au fost aplicate și alte metode.

Biobalistica. Se bazează pe "sistemul proiectil" (denumit de unii autori "tun genic") care țintește țesuturile plantelor, în fapt "celulele vegetale" cu particule de aur sau tungsten cu diametru de 1 mm, acoperite cu DNA. Prin metoda biobalistică (numită și biolistică) particule penetrează peretele celular rigid al plantelor și permit pătrunderea DNA. Celulele care au încorporat noul DNA în genom numite și "celule-recipient" asigură creșterea plantelor transgenice.

Electroporația. În mod normal, într-o soluție în care se incubează fragmente de DNA și celule vegetale, nu este posibil tranzitul DNA datorită membranei celulare care constituie - în condiții normale - o barieră non-penetrabilă. Dacă se aplică impulsuri electrice scurte, se formează pori minusculi (electroporație) în membrana celulară prin care este posibilă penetrarea DNA și încorporarea acestuia în genom. Celulele care au încorporat DNA sunt selectate asigurându-se integrarea acestora și creșterea în plante transgenice, exprimând gena dorită (așa numita "genă de interes").

Microinjectarea. Inițial molecula de DNA este introdusă prin "microinjectare" - în celule-recipient utilizându-se tehnici microscopice specifice. Se utilizează DNA plasmidal. Metoda se pretează utilizării predilect la animale (mamifere și pești).

Chemoporația. Este o procedură de transfer a genelor mediată lipidic. Se obțin din lipide cationice și DNA complecși stabili cu DNA. Aceștia crează "pori" (orificii

transmembranare) care asigură translocarea unui fragment de DNA prin membrana plasmatică de natură lipoproteică şi de aici în genomul celular.

9.7.2.2. Etapele transgenezei

Pentru realizarea transgenezei se impune instituirea unei succesiuni de trei etape distincte: a) identificarea genei de interes; b) transferul genei de interes în celula eucariotă (vegetală sau animală); c) selectarea organismelor modificate genetic (vizează plante sau animale care evidenţiază fenotipic integrarea transgenei în genomul propriu).

A. Identificarea genei de interes.

Pentru identificarea "genei de interes"; se utilizează "bănci de gene" realizate prin metode specifice biologiei moleculare.

Băncile de gene sunt constituite din "fragmente de DNA" obţinute prin clivaj molecular (secţionarea biochimică a unei macromolecule de DNA) prin utilizarea unor enzime de restricţie (ER) specifice.

După identificarea genei de interes din cadrul băncii de gene, aceasta trebuie integrată într-o celulă-recipient. Pentru ca acest fapt să devină posibil, gena de interes trebuie să se afle în cantitate suficient de mare pentru a fi supusă transgenezei. Iniţial se procedează la fixarea genei de interes pe un vector, frecvent folosindu-se în acest sens, spre exemplu, plasmidele colibacilului intestinal Escherichia coli.

În general se urmăreşte să se ajungă la aşa numita «construcţie genică» care conţine gena de interes formată din DNA eucariotic şi vectorul reprezentat prin DNA plasmidal procariotic. În final DNA rezultat (i.e. DNA recombinant) se introduce într-un mediu de substanţe care conţine antibiotice. Pe acest mediu, în continuare, are loc înmulţirea bacteriilor şi, evident, a plasmidelor din constituţia acestora.

B. Transferul genei de interes în celula eucariotă

În această secundă etapă DNA recombinant, în care se află integrată şi gena de interes, se extrage din bacterii şi se introduce în celula vegetală. În mod curent această introducere se realizează prin metoda biobalistică - calea directă sau prin transfecţie - cale indirectă (dar naturală) care necesită folosirea microorganismului Agrobacterium tumefaciens.

Aşa cum se cunoaşte, în cazul metodei biobalistice se procedează la utilizarea unui "sistem proiectil" (bazat pe particule metalice), care vehiculează DNA recombinant în care este prezentă gena de interes. Procedeul a fost utilizat pentru obţinerea unor linii de soia.

În majoritatea cazurilor pentru obţinerea de plante transgenice se utilizează sistemul Agrobacterium. Bacteriile din acest gen asigură o cale naturală pentru transferul de gene. Cu ajutorul

Agrobacterium se poate transfera un cuantum redus de DNA al unei plasmide în nucleul unei celule vegetale.

C. Selectarea organismelor modificate genetic.

Această terță etapă rezidă în selecția plantelor supuse transformării pentru cazurile în care transgena s-a integrat în genom.

În general, celula transformată în nucleul căreia se află gena de interes integrată în DNA al plantei-receptor, se poate cultiva într-un mediu selectiv. În cazul plantelor, în acest mediu celulele regenerează lăstari şi, ulterior, din aceştia se obțin plante transgenice.

În cazul organismelor modificate genetic (OMG) procedura, din punct de vedere teoretic, este similară la celulele vegetale şi la celulele animale. Sub raport practic, de la caz la caz, este eficientă transfecția biobalistică, electroporația şi chiar chemoporația.

9.7.3. APLICAȚII PRIVIND ORGANISMELE MODIFICATE GENETIC ÎN AGRICULTURĂ

Producerea unor plante cu fenotip transformat depinde de abilitatea de a introduce DNA recombinant în genomul plantei (Gârban, 2001). Metoda cea mai uzuală este transfecția prin introducerea plasmidei T_i (DNA-T_i)din bacteria Agrobacterium tumefaciens (Rogers şi Parkers, 1995; Badea, 2003).

În principiu, teoretic, plante din orice familie pot fi transformate de Agrobacterium tumefaciens. În practică, domeniul este limitat, datorită dificultăților de regenerare a multor psecii de cultură, incluzând majoritatea cerealelor (Binns, 1988, Dasnek, 1997).

Transferul DNA poate fi realizat direct în protoplaste, utilizând metodele de electroporație sau de chemoporație (e.g. prin tratarea celulelor cu polietilenglicol şi calciu) pentru integrare în genomul plantei.

În agrobiologie aplicațiile biologiei moleculare pot interesa şi fitopatologia (patologia vegetală). De-a lungul secolelor, recoltele au fost îmbunătățite prin programe tradiționale, dar ingineria genetică oferă un mod de a modifica direct fenotipul cerealelor. Un exemplu îl constituie transferul de la bacteria Bacillus thuringiensis la porumb a genei care codifică toxina T, o proteină care este un posibil insecticid. Plantele astfel tratate sintetizează toxina T în țesuturi şi nu mai sunt expuse atacului insectelor. Deci, nu va mai fi necesară aplicarea tratamentelor chimice.

Reconsiderarea unor aspecte evolutive relevă faptul că referitor la organismele modifiacte genetic (OMG) se semnalează faptul că în 1986 s-a realizat un test experimental prin care s-au obținut organisme transgenice. Este impresionant de observat că în prezent testările au depăşit numărul de 100

specii de plante. Principalele plante modificate genetic şi aflate în culturi agricole destinate comerţului sunt: soia, porumbul, bumbacul, rapiţa. Suprafeţe mai mari pentru cultura plantelor incluse în categoria organismelor modificate genetic din regnul vegetal, există în SUA, Canada, Argentina, China.

Aplicaţii ale biotehnologiilor la plante sunt prezentate sub forma unei sinteze privitoare la domeniile abordate (Srivastava, 1998) şi relevă drept directive majore: a) obţinerea unor plante rezistente la boli,epidemii şi stres; b) păstrarea fructelor şi legumelor proaspete pe perioade îndelungate (aspect extrem de important în ţările tropicale); c) obţinerea de plante cu conţinut ridicat de lipide sub formă de uleiuri; d) obţinerea de plante cu valoare nutritivă crescută; e) producerea de soiuri de soia cu o expresie care conţine proteine anti-cancer; f) modificarea conţinutului de lignină la arbori astfel încât rata extracţiei fibroase pentru industria hârtiei să fie crescută; g) producerea în plante a unor substanţe care prezintă interes farmacologic pentru om şi animale (e.g. vaccinuri care se menţin în stare naturală în rizomi, tuberculi sau în fructe).

Biotehnologia s-a dovedit a fi unul din domeniile de vârf ale ştiinţelor contemporane, care se preconizează că va contribui la creşterea competitivităţii pe piaţa produselor agroalimentare.

Din analiza nevoilor societăţii şi a impactului socio-economic pe care îl crează noile metode de producţie şi prelucrare, reiese o creştere a complianţei populaţiei la aceste produse.

9.7.4. APLICAŢII PRIVIND ORGANISMELE MODIFICATE GENETIC ÎN ZOOCULTURĂ

În cazul aplicaţiilor biologiei moleculare în domeniul animal s-au urmărit, de asemenea, efectele transgenelor. A produce un animal transgenic înseamnă a crea un animal care are acelaşi tip de DNA în fiecare celulă. Acest lucru se poate realiza prin includerea de DNA în celule, înainte de începerea procesului de diviziune celulară.

Crearea de animale transgenice este mult mai complexă decât generarea de bacterii (organisme unicelulare) sau plante transgenice. Celulele germinative, ca celule gonadice (donocite, i.e. ovule şi spermatozoizi) sunt singurele celule animale capabile să formeze (prin amfimixia pronucleilor) zigotul din care va evolua produsul de concepţie.

Una din tehnicile folosite pentru obţinerea OMG în zoocultură este microinjectarea: DNA recombinant este injectat direct în celula zigot, înainte de începerea diviziunii. Acest DNA va fi încorporat într-un cromosom din nucleu şi va fi prezent în fiecare celulă a animalului rezultat, ceea ce permite transmiterea sa în filiaţie ereditară.

Microinjectarea este un proces aleator. Există posibilitatea ca DNA "injectat" să nu fie încorporat într-un cromosom din zigot, adică nici una din celulele organismului rezultat să nu conţină DNArecombinant.

Aplicațiile tehnologiei DNA recombinant în zootehnie au condus la obținerea de OMG la ovine, suine, galinacee etc.

A. Oi transgenice. Au fost obținute prima dată în iulie 2000, inserând transgena alfa 1-antitripsină într-un locus specific. Tehnica utilizată s-a bazat pe culturi celulare în care au fost crescute fibroblaste de oaie. Acestea au fost tratate cu un vector care conținea următoarele fragmente DNA: a)două regiuni omoloage genei COL1A1 care codează colagen tip I; b) o genă rezistentă la neomicină pentru a izola celulele care au încorporat vectorul; c) gena umană care codează alfa 1-antitripsina; d) situri promotoare ale genei beta-lactoglobulinei; e)situri de legare a ribosomilor pentru o translație eficientă a mRNA

Utilizând modul de operare specific tehnologiei DNA recombinant s-au obținut oi transgenice.

B. Porci transgenici. Obținerea de porci transgenici s-a făcut prin fertilizare cu celule spermatice în care a fost încorporat DNA străin. Acest procedeu va sta, probabil, la baza creării de porci transgenici folosiți ca sursă de organe destinate transplantului la om (xenotransplante de organe).

C. Găini transgenice. Pentru obținerea de găini transgenice există două metode care au uzitate în cercetările din acest domeniu. Acestea rezidă în:

1) infectarea embrionilor de galinacee (deci a ouălor puse la incubat) cu un vector viral care transportă gena umană pentru o proteină terapeutică sau secvența promotoare care răspunde la semnalul formării proteinelor în albușul de ou
2) transformarea spermei de galinacee (de la cocoș) prin introducerea în gonocite a unei gene umane și a promotorilor apropiați acesteia, după care se procedează la analiza eventualei apariții de produși de concepție transgenici

Rezultate preliminare indică faptul că fiecare găină (care reprezintă un OMG) poate produce 0,1g proteină umană în fiecare ou depus. Un avantaj îl constituie faptul că găinile adaugă glucidele corespunzătoare la proteinele glicosilate. Această formare de glucoproteine nu este posibilă în cazul utilizării de vectori plasmidali de la Esherichia coli

9.7.5. TRANSGENICITATEA ȘI AMBIENTUL

Cu privire la organismele modificate genetice (OMG) și relația acestora cu mediul ambiant există unele observații, care au reținut atenția specialiștilor, au polarizat lumea științei și au furnizat date pentru unele conotații de interes legislativ.

Referitor la OMG și anumite caracteristici fenotipice obținute la plante, se exemplifică existența de plante transgenice în care apar :

- *fitohormonul "etilena"* - important prin faptul că intervine în procesul de coacere. Sinteza etilenei poate fi încetinită, în acest mod prelungindu-se coacerea cu 1 - 4 săptămâni. Pentru aceasta se intervine la nivelul genelor care asigură şi sinteza enzimelor *acid ciclopentancarboxilic-sintaza (ACC-sintaza)* şi *acid ciclopentancarboxilic-oxidaza (ACC-oxidaza)*. Aceste enzime intervin în două reacţii de biosinteză :

metionină -----> ACC, respectiv ACC -----> etilenă

Studiile privind OMG în relaţie cu efectul etilenei s-au efectuat pe tomate (importante în industria alimentară: conserve, paste, sosuri ketchup etc.);

- *poliglucide cu structuri modificate* - se pot obţine prin biotehnologii specifice aplicate la porumb, cartof, grâu, orez. Amidonul (poliglucidă care conţine α-D-glucopiranoză) din boabele de porumb, grâu, orez şi tuberculii de cartof este format din amiloză şi amilopectină. În amidonul din cereale raportul amiloză/amilopectină este de cca 30/70. Diferenţele de structură moleculară caracterizează şi proprietăţile reologice, e.g. amilaza - are proprietăţi gelifiante, amilopectina - este agent de îngroşare. Pentru valorificare în alimentaţie este preferabil ca, prin mijloace specifice biologiei moleculare, să se modifice raportul amiloză/amilopectină. Creşeterea cuantumului amilopectinei în tuberculii de cartof de la 21-22% la cca 25% poate conduce la scăderea absorbţiei grăsimilor în cursul preparării culinare (e.g. în cartofii preparaţi sub formă de "chips") îmbunătăţindu-se digestibilitatea acestora şi scăzând riscul excesului de lipide alimentare.

- *proteine naturale dulci* - se pot obţine din fructe, prin aplicarea mijloacelor specifice biotehnologiei (bazată pe ingineria genetică), e.g.: *monelina* - transferând gene de la fructe în tomate şi salată; *taumatina* - transferând gene de la fructe la cartof şi castravete.

Există, de asemenea, proiecte pentru obţinerea în plante a unor produse speciale, e.g. plante transgenice cu conţinut crescut în lignină pentru industria hârtiei; plante de rapiţă care produc un "material plastic biodegradabil" etc. De asemenea, rămân importante obiectivele de obţinere a plantelor care au rezistenţă crescută la insecte, la ierbicide, la stresul termic etc.

În practica obţinerii OMG, este important a cunoaşte şi aspecte particulare ale «relaţiei OMG-ambient», care poate evidenţia posibile efecte nocive, indezirabile, şi este legată de:

a) modificarea proceselor metabolice, a diferiţilor căi biochimice cata- şi anabolice

b) transferul noilor atribute geno- şi fenotipice la alte plante (din culturi agricole sau din flora spontană) prin polenul vehiculat de vânt sau insecte.

c) posibil impact, imprevizibil, asupra altor specii din culturile agricole sau din flora spontană. Aceasta poate conduce la reducerea surselor de nutrienţi, necesar altor specii. De asemenea, se poate exacerba parazitismul la alte specii (ca o consecinţă a interacţiunii interspecifice).

d) riscul de-a se produce modificări indezirabile care afectează digestibilitatea şi comestibilitatea altor plante din flora spontană (interesând furajele ierbivorelor) sau din plantele de cultură, interesând chiar alimentația omului.

În fine, observațiile asupra riscului posibil apar odată cu fiecare manipulare genetică efectuată la plante. Aceasta poate afecta plantele din arealul existențial.

Din aceste considerente, în toate țările care au acreditat aplicațiile biologiei moleculare în agrobiologie prin efectuarea de cercetări de inginerie genetică sau includerea în culturile agricole a unor plante asupra cărora s-au efectuat manipulări genetice - s-au introdus reglementări juridice.

Pentru utilizarea OMG au fost întreprinse diverse acțiuni pe plan internațional. Astfel, inițial s-a elaborat "Convenția privind Diversitatea Biologică" (biodiversitatea) stabilită la Rio de Janeiro" (5 iunie 1992). Apoi, s-a elaborat "Protocolul privind Securitatea Biologică" (i.e. Protocolul de la Cartagena) definitivat la Montreal în anul 2000.

Sub aspect juridic se face remarca faptului că privitor la măsurile referitoare la OMG s-au făcut referiri în diverse documente de interes internațional. În Europa există şi prevederi ale Uniunii Europene în Tratatul de la Maastricht, 1992. În USA există prevederi privind implicarea unor agenții guvernamentale, i.e. Departamentul pentru Agricultură (USDA), Administrația pentru Alimente şi Medicamente (FDA), Agenția pentru Protecția Mediului (EPA).

În România s-a emis, de asemenea, o legislație privitoare la organsmele modificate genetic. Se menționează în acest sens Ordonanța de Guvern (OG) 49/2000 privind regimul de de obținere, testare, utilizare şi comercializare a OMG prin tehnicile biotehnologiei moderne şi a produselor rezultate din acestea - publicată în Monitorul Oficial (MO) 48/31.01.2000. Ulterior s-a elaborat Legea 214/2002, publicată în MO 316/14.05.2002 ş.a.

În general, în toate țările au fost stabilite norme privind obținerea, testarea, utilizarea şi comercializarea organismelor modificate genetic (plante, animale, microorganisme). Aceste norme urmăresc stabilirea cadrului juridic şi instituțional menit a evita riscurile producerii unor efecte negative.

Din punct de vedere juridic se face referire la aplicarea "principiului precauției" ca o măsură *a priori* în relație cu posibilele consecințe, indezirabile care pot avea la origine OMG. Există în acest sens interpretări moderate, dar şi interpretări ferme care fac referire la relația ştiință-societate (observația privită cu atenție permite unele comparații paralele cu problemele ridicate la mijlocul secolului XX de Fizică atomică).

Există şi alt mod de abordare, care face trimitere la perspectiva evaluării riscului *a posteriori*. În această situație evident se evaluează cauzele şi efectele unui anumit "accident biologic" după evoluția acestuia.

Intervenția a priori prin stabilirea de măsuri preventive se bazează pe "prezumția de periculozitate" şi este valabilă pentru oricare aplicație a ştiințelor care conferă incertitudine.

În general, problema aplicațiilor biologiei moleculare în biotehnologiile moderne, menite a obține OMG, trebuie să constituie obiectul unor măsuri legislative care să stabilească cadrul legal al cercetărilor fundamentale şi aplicative în acest domeniu.

Aplicarea biotehnologiilor vegetale implică evaluarea *«siguranței alimentului»*. Promisiunile oferite de biotehnologia vegetală pentru agricultură și nutriție sunt semnificative. Evaluarea siguranței alimentului obținut de la organisme modificate genetic este necesară pentru a asigura *«protecția consumatorului»*. Siguranța alimentului poate fi determinată prin stabilirea echivalenței între produsele modificate genetic și alimentele convenționale, evaluarea toxicității potențiale și identificarea produselor alergene. Combinând aceste metodologii se vor putea introduce tehnologii moderne în care prevalează condițiile de «siguranța alimentului» și preceptele aplicate în producția convențională de alimente.

9.8. BIOTEHNOLOGIILE - CADRUL SINOPTIC

9.8.1. ASPECTE INTERDISCIPLINARE

Biotehnologiile sunt constituite dintr-un ansamblu de procedee industriale la baza cărora stau procese biologice. In cadrul biotehnologiilor se conturează relația de tip triadă: procese biologice - echipamente tehnologice - procedee industriale.

In acest context elaborarea unor biotehnologii implică, în primul rând, cunoaşterea proceselor biologice care se pot preta industrializării, avându-se în vedere diversele aspecte particulare (biologice, biochimice, biofizice, genetice). De asemenea, în scopul industrializării, se iau în considerare aspectele generale-tehnologice bazate pe ştiințele exacte (matematica, fizica şi chimia) şi ştiințele inginereşti (termodinamica, fenomene de transfer, electrotehnica, automatizări, etc).

O abordare integrată a problemelor biotehnologice poate conduce la înțelegerea mecanismelor caracteristice proceselor biologice, reproducerea acestora şi, în final, includerea acestora în procedee industriale (Maximilian şi Ioan, 1984; James, 1992; Gârban, 1994; Ensminger et al., 1995; Radu, 2001).

În general, referitor la aplicațiile biologiei moleculare în biotehnologii se poate afirma că acestea s-au dezvoltat în două direcții orientate fiind spre acizii nucleici şi spre proteine.

Biologia moleculară a acizilor nucleici - a fost identificată adesea cu ingineria genetică. În esență se poate constata că aceasta este orientată îndeosebi spre tehnologia DNA recombinant cu câteva obiective esențiale:

- selectarea DNA cu rol de vector;
- obținerea fragmentelor DNA cu rol de pasager;
- producerea DNA cu extremități coezive: DNA vector şi DNA pasager;
- formarea moleculelor de DNA recombinant;
- identificarea noilor molecule care trebuie să conțină în structurile integrate DNA vector şi DNA pasager (deci DNA recombinant);

- inserarea şi propagarea DNA recombinant în celula-recipient, bazată pe procese de transformare, transfecție, creştere;
- selectarea transformanților sau transfectanților - semnificând izolarea celulelor, i.e. "celule de elecție" - purtătoare de structuri caracteristice rezultate în urma proceselor de replicație - transcripție - translație;
- identificarea produsului final al DNA recombinant, rezultat după translație, i.e. proteina nou sintetizată.

Biologia moleculară a proteinelor - se poate detaşa ca un domeniu aparte interesând proteinele rezultate din aplicațiile tehnologiei DNA recombinant (mai riguros pecizat: biotehnologiei DNA recombinant). Obiectivele acestea se pot sumariza astfel:

- izolarea şi purificarea proteinelor;
- dozarea şi secvențializarea;
- investigarea conformației moleculare;
- tipizarea funcționalității, e.g.: hormoni, enzime, imunomediatori etc.

În aplicațiile de interes biotehnologic, prin complexitatea cadrului interdisciplinar, se regăsesc disciplinele care stau la originea biologiei moleculare, deci: biochimia, microbiologia, genetica, fizica, fizico-chimia. Utilizarea performanțelor interdisciplinare oferite de aceste domenii a stat la baza dezvoltării cunoştințelor asupra aplicațiilor biotehnologice ale biologiei moleculare.

9.8.2. INTERCONEXIUNI ALE BIOTEHNOLOGIILOR

Aprofundarea problemelor teoretice şi aplicative din domeniul biotehnologiei impune o tratare inter- şi multidisciplinara. La interferența acestora se pot distinge trei aspecte de fond: 1) procesele biologice; 2) echipamentele tehnologice; 3) procedeele industriale.

9.8.2.1. Procese biologice

Studiul proceselor biologice sau a sistemelor biologice care generează aceste procese se impune cu scopul elaborării unor procedee care se pretează producției industriale. Sistemele biologice luate în studiu pot fi microorganisme (bacterii, actinomicete, levuri), celule animale sau vegetale, organite celulare sau molecule izolate (e.g. enzime). Aceste sisteme pot fi naturale sau manipulate de om (DNA recombinant, enzime artificiale).

Pentru utilizarea la scară industrială a proceselor biologice se urmăreşte orientarea activității de cercetare în direcția ameliorării performanțelor acestor procese. Evaluarea performanțelor - în cazul proceselor biologice se face în relație cu condițiile de creştere

pentru microorganisme sau cu viteza de reacţie şi randamentul de producere a metaboliţilor.

9.8.2.2. Echipamente tehnologice

Pentru aplicaţiile industriale ale proceselor biologice se impune conceperea unor echipamente tehnologice speciale cum ar fi reactoarele microbiologice, celulare sau biochimice. Construcţia unor astfel de reactoare - numite cu un termen generic *bioreactoare* - impune înţelegerea unei variate problememática care priveşte designul, dimensionarea sau fiabilitatea echipamentelor.

Definirea caracteristicilor constructive, în conceperea unui bioreactor, trebuie să aibă în vedere exprimarea plenară a potenţialităţii procesului biologic.

In proiectarea şi construcţia bioreactoarelor este importantă de asemeni gestionarea şi evaluarea performanţelor echipamentelor. Un exemplu în acest sens poate fi reprezentat de necesitatea cunoaşterii şi evaluării componentului hidraulic al unui reactor cu pat fluidizat (aparţinând tehnologiilor moderne).

Cunoaşterea echipamentului de talie industrială - în care urmează a se realiza procesele biologice - se impune atât sub aspectul concepţiei, al conducerii şi superreglării (aspecte chimice sau biologice) cât şi al legilor care le guvernează (termodinamica industrială, transfer de materie şi energie, etc). In final se realizează integrarea unui proces biologic (microbiologic, enzimatic ş.a.) într-un bioreactor care se pretează unui domeniu aplicativ specific.

9.8.2.3. Procedee industriale

Prin integrarea proceselor biologice într-o succesiune de operaţii (scheme de operaţii) şi utilizarea unor echipamente adecvate incluse în cadrul unei instalaţii (scheme de instalaţii) se realizează procedeul industrial. In această manieră, în domeniul biotehnologiilor, se trece de la faza de concepţie spre faza finală de realizare la scară industrială.

Punerea în practică a proceselor industriale impune familiarizarea cu informatica în scopul controlării fluxului informaţional. De asemenea, se impune determinarea naturii substanţelor (analiza pe proces: substrate şi produşi de reacţie) şi determinarea parametrilor funcţionali ai bioreactorului (analiza pe procedeu: debite, temperaturi). Intr-un context mai larg, în domeniul biotehnologiilor, se impune o bună gestionare economică şi socială a proceselor industriale.

10. APLICATII CU SPECIFIC BIOMEDICAL

10.1. CONSIDERATII GENERALE

Aplicaţiile cu specific biomedical ale biologiei moleculare au cunoscut o extindere şi diversificare tematică impresionantă, adresându-se stărilor normale şi patologice. Stările patologice studiate au inclus afecţiuni congenitale (eredopatologice) şi dobândite, interesând patobiochimia şi fiziopatologia (Grobstein, 1977; von Sengbusch, 1979; Darnell et al., 1986; Griffiths et al., 1993; Wilson şi Walker, 1994).

Se remarcă faptul că au premers, în unele cazuri, aplicaţiile în domeniul biotehnologiei. Progresele au fost facilitate de aprofundarea investigaţiilor asupra DNA (Davidson, 1972; Wu, 1978; Cohn, 1979; Maniatis et al.,1982; Boffley,1992) şi de perspectivele deschise de cunoaşterea metodelor specifice biologiei moleculare (Tiollais şi Rambach, 1977; Benga, 1985; Erlich, 1989; Arnheim şi Erlich, 1992).

În cazul aplicaţiilor biomedicale - în raport cu investigarea DNA - acestea prezintă o diversitate condiţionată de scopul urmărit şi corelabilă cu nivelul de filiaţie moleculară explorat. Cu referire la acestea se vor exemplifica doar unele domenii.

De asemenea, se menţionează aplicaţii în: diagnosticul prenatal; medicina legală, cartarea genomului, mutageneza in vitro, terapia genică ş.a. Dintre acestea se vor prezenta doar câteva exemple.

10.2. EXPLORAREA NIVELELOR DE FILIAŢIE

In investigarea DNA este posibilă reconstituirea genealogiei moleculelor prin decelarea şi compararea secvenţelor nucleotidice. Acest fapt se datoreaza caracterului semiconservativ al replicaţiei.

Astfel de investigaţii au o largă aplicabilitate deoarece permit abordarea, fără exceptie, a tuturor aspectelor de **filiaţie moleculară**. In acest context se pot menţiona unele probleme generale referitoare la:

a) *genetica celulară (citogenetica)* - corelată cu filiaţia la nivel de celulă. Aceasta a făcut posibil studiul mono- şi policlonalităţii, explorarea aberaţiilor cromosomiale, identificarea fragmentelor cromosomiale translocate ş.a.

b) *patologia genetică şi medicina legală* - în corelaţie cu filiaţia la nivel de individ, raportat la familie. Studiile de *patologie genetică* au permis aprofundarea cunoştinţelor referitoare la bolile ereditare. Astfel a fost posibil diagnosticul genotipic. Cu ajutorul metodelor specifice biologiei moleculare au fost investigate gene situate pe cromosomul X (e.g. genele pentru hemofilia A şi B, genele pentru miopatia Duchenne ş.a.); gene autosomale (e.g. pentru talasemie, fenilcetonurie, hipercolesterolemia familială, mucoviscidoză ş.a.). In cadrul aceluiaşi nivel de filiaţie se înscriu investigaţiile de medicina legală care au permis, spre exemplu, stabilirea parentalităţii.

c) *genetica populaţiilor şi antropologia* - se pot corela cu filiaţia la nivel de individ raportat la diferite populaţii. In cadrul studiilor privind genetica populaţiilor se face investigarea DNA vizând particularităţile secvenţelor nucleotidice în relaţia individ-specie (se pretează studiilor atât pentru regnul vegetal cât şi pentru regnul animal). Aplicaţiile în antropologie s-au constituit ca un domeniu distinct abordând studiile despre om în relaţia fond genetic - condiţii ambientale sau în relaţia taxonomie - antropogeneză etc.

d) *filogeneza moleculară* - se corelează cu filiaţia la nivel de specii diferite raportate la apartenenţa taxonomică. Aceasta poate fi considerată ca o "anatomie comparată a genomului" (Kaplan şi Delpech, 1990). Adresabilitatea investigatiilor vizează diferitele specii interesând organismele procariote şi eucariote (vegetale şi animale). O menţiune aparte se face la aşa numita taxonomie moleculară (biochimică) cu aplicabilitate în botanică şi zoologie.

Inserarea modalităţilor de explorare a nivelelor de filiaţie moleculară oferă o imagine sinoptică a diversităţii aplicaţiilor pe care le oferă studiul DNA. Dintre acestea se va face referire la un număr restrâns de aplicaţii de interes practic.

10.3. DIAGNOSTICUL PRENATAL

Acest diagnostic, în accepţia biologiei moleculare, se bazează pe anomaliile DNA constituţional şi se practică în cazul că există un risc a priori (e.g. riscul naşterii unui copil cu anumite "tare" genetice). Riscul genetic este calculabil pentru fetus şi poate fi evaluat prin analiza genotipică.

Pentru studiul DNA fetal se face prelevarea, prin biopsie, a unor excizate vilozitare coreale (trofoblastice), care conţin amniocite (celule amniotice). Procedura de prelevare este cunoscută sub numele de amniocenteză şi se practică aproximativ în săptămâna 17-a de sarcină (Henrion et al., 1987 - citaţi de Kaplan şi Delpech, 1990). Totuşi această investigaţie a DNA amniocitar se estimează că furnizează un diagnostic tardiv. Din aceste motive este preferată investigarea DNA din trofoblast între săptămânile 8-12 de amenoree. Pentru investigare se aplică metoda RFLP care asigură minimum de detalii pentru diagnostic.

Metoda RFLP permite urmărirea modului de transmitere a unor gene mutante în cadrul unei familii în succesiunea generaţiilor. Pentru urmărirea genelor mutante se folosesc sonde DNA marker, eficiente în diagnosticul prenatal (Hauge, 1989).

In accepţia cunoştiinţelor actuale se considera că este preferabilă analiza genotipică înainte de concepţie - procedeu care stă la baza conceptului de "medicină predictivă".

10.4. OBŢINEREA DE MEDIATORI CHIMICI PENTRU RASPUNSUL IMUN

In categoria mediatorilor chimici ai răspunsului imun se includ diversele *limfokine*, i.e. interleukinele, interferonii, cîţiva factori de stimulare (pentru macrofage şi granulocite) şi factori necrozanţi ai tumorilor (casectina, limfotoxina).

Dintre aceştia, în biologia moleculară – cu deosebire în aplicaţiile de interes biotehnologic – sunt importante doar *interleukinele* (IL) şi *interferonii* (INF). Denumirea de "limfokine", păstrată în uz, nu prezintă rigoare, nefiind justificată de sursa de producere a unor meditori chimici. Se menţionează în acest sens faptul că există "limfokine" de tipul interleukinelor care nu sunt produse de limfocite, e.g.: inteleukina IL-1 este produsă de monocite şi macrofage. În continuare se vor prezenta date generale privind interferonii şi interleukinele.

10.4.1. INTERFERONII

Interferonii (lat. interferire - a interfera, a se împotrivi) sunt glicoproteine a căror biosinteză este declanşată în celule după o infecţie virală (Isaacs şi Lindemann, 1957). Denumirea de interferon derivă de la "fenomenul de interferenţă" determinat de aceşti compuşi - fenomen care rezidă în inducerea unei stări de rezistenţă parţială sau completă a celulei, ţesutului sau chiar organismului în raport cu un virus infectant.

Biosinteza interferonilor poate fi indusă de **toate virusurile**, precum şi de **agenţi nevirali**, e.g.: unele bacterii, extracte bacteriene, ricketsii, protozoare. Mai mult, s-a observat că biosinteza poate fi indusă chiar de acizi nucleici virali, polinucleotide obţinute prin sinteza chimică organică, unele lectine (i.e. fitohemaglutinina, concavalina A) ş.a. Evident agenţii "inductori" naturali de maximă eficienţă rămân virusurile, care stau la originea sintezei atât in vivo cât şi in vitro.

Interferonii sub raportul structurii chimice (glicoproteine) şi activităţii biologice (fenomenul de interferenţă) prezintă o înaltă specio-specificitate. Acest fapt face ca biosinteza şi utilizarea terapeutică să fie limitată doar la anumite specii producătoare.

In prezent interferonii (mai exact diversele tipuri de interferoni) sunt consideraţi ca agenţi de maximă eficienţă în terapia antivirală şi chiar antitumorală.

Interferonii umani, notaţi prin acronimul Hu-IFN (Human - Interferon), se includ în trei tipuri: Hu-IFNα, HU-IFNβ, HU-IFNγ (Stewart et al., 1980).

- interferonul de tip Hu-IFNα este produs de limfocite şi în măsură mai mică de limfoblaste (90%). In legătură cu interferonul de tip Hu-IFNα se menţionează că în cadrul acestui tip au fost decelate trei subtipuri: α_1, α_2, α_3 (Streuli et al., 1980).
- interferonul de tip Hu-IFNβ este produs aproape exclusiv de fibroblaste şi în cantităţi mici de limfoblaste (10%)
- interferonul de tip Hu-IFNγ, numit şi "interferonul imun", este produs de limfocitele T stimulate.

Inteferonii de tip α şi β sunt relativ omogeni având masa moleculară mică (cca 20.000 Da), pe când interferonul de tip γ - mai heterogen structural - are masă moleculară mai mare.

Mecanismul de acţiune al interferonilor relevă mai multe căi, între acestea se menţionează:

a) induce biosinteza de enzime (e.g.: protein-kinaza), care inhibă traducerea mRNA viral;

b) determină formarea de acid 2', 5' - oligoadenilic care activează o endonuclează celulară şi prin intermediul acesteia se produce degradarea acidului nucleic viral cu oprirea înmulţirii virusului;

c) produce o deficienţa de tRNA celular (prin intermediul fosforilazelor) care contribuie la degradarea nucleotidelor terminale din tRNA şi astfel blochează elongarea catenei polipeptidice.

Unul din obiectivele tehnologiei DNA recombinant a fost, între altele, şi obţinerea de interferoni. Dificultaţi au fost ridicate de heterogenicitatea interferonilor (i.e. existenţa

mai multor tipuri). Pentru aceasta există mai multe metode (Popa şi Repanovici, 1982; Zarnea, 1986), asupra cărora nu se va insista. In toate situaţiile a fost necesară obţinerea genei interferonului.

Realizarea practică a sintezei s-a făcut pornind de la leucocite umane (tratate cu virus Sendai). După obţinerea mRNA matriţa, cu ajutorul reverstranscriptazei s-a obţinut, în final, DNA complementar (cDNA). In prezenţa polinucleazei I s-a format cDNA dicatenar. Drept vector a fost utilizată plasmida pBR 322 (masa moleculară 2.600.000 Da). Investigatii ulterioare au permis aprofundarea informaţiilor constatându-se că pentru interferonul uman Hu-IFNa există 14 gene diferite (Weissman, 1982).

După extinderea producerii de interferoni, aceştia au fost testaţi clinic în cazul unor boli virale (e.g.: herpes, hepatită, gripă ş.a.) şi a unor forme de cancer (e.g.: limfoame, osteosarcoame, cancer mamar ş.a.) remarcându-se regresul tumorilor. In studiul acţiunii antitumorale s-a observat ca producerea de acid 2', 5'- oligoadenilic determină, în unele cazuri, regresul tumorilor prin inhibarea diviziunii celulare (Ravel şi Chebath, 1986). Cercetările ulterioare au relevat o reducere a cuantumului unor proteine celulare caracterizat în primul rând prin depresia biosintezei de histone şi a unor proteine nucleare. Date riguroase asupra unui posibil mecanism de acţiune nu se cunosc.

Interferonii ca *substanţe biologic-active* se pot caracteriza prin proprietăţi fiziologice şi farmacologice distincte.

a) Proprietăţile fiziologic. S-a constatat că acţiunea interferonilor se caracterizează prin:

α) *Efecte asupra anticorpilor*. S-a observat acţiunea asupra dezvoltării şi maturării limfocitelor B - angajate în producerea de anticorpi.

β) *Efecte de tip endorfinic*. Acestea rezidă în acţiunea analgetică şi sedativă. Denumirea acestor "efecte" derivă de la rolul fiziologic al endorfinelor, sintetizate predilect la nivelul sistemului nervos central.

b) Proprietăţile farmacologice conferă interferonilor utilitate farmaceutică şi au fost relevate de varii efecte.

α) *Efectele antivirale*. In tratamentele virozelor, interferonii dovedesc o eficacitate crescută în raport cu medicamentele antivirale sintetice. Efecte bune s-au obţinut în infecţiile virale acute, e.g.: viroze respiratorii, hepatită de tip B, precum şi în tratamentul unor tumori benigne de origine virală, e.g.: papilomatoza. In virozele cronice au efecte reduse.

β) *Efectele antiproliferative citostatice*. S-a observat că interferonii au efecte antiproliferative marcante asupra celulelor normale. Această constatare a condus

la ideea utilizării interferonilor pentru tratamente citostatice în anumite forme maligne, e.g.: leucemie, mielom multiplu, limfoame non-Hodgkin, ş.a. Nu au efecte în tumori mamare, pulmonare, intestinale (stomac, colon).

γ) *Efectele imunomodulatorii*. Aceste efecte sunt importante pentru aşa numita apărare specifică şi nespecifică a organismului.

Investigaţiile farmacologice şi clinice au relevat şi existenţa unor efecte bune în tratamente efectuate pentru: poliartrită reumatoidă, boli parazitare şi chiar în leuconevraxită.

Cu titlu informativ se menţionează existenţa unor efecte secundare induse de interferoni, e.g.: febră, frison, cefalee, inapetenţă, depresie, nervoasă. Evident aceste fenomene se corelează cu doza administrată (relaţia doză-efect).

10.4.2. INTERLEUKINELE

Interleukinele sunt substanţe proteice biologic-active, cu rol de mediatori chimici ai răspunsului imun, care aparţin categoriei citokinelor şi sunt considerate *"imuno-hormoni"*. Graţie acestor mediatori chimici, celulele sistemului imunitar (imunocitele) "comunică" contribuind la creşterea rezistenţei acestui sistem imunitar.

Acţiunea interleukinelor a fost relevată în diferite etape ale cooperării celulelor sistemului imunitar, ca semnale endogene care se asociază acţiunii antigenelor şi astfel concură la amplificarea mecanismelor de apărare locale şi sistemice ale gazdei, în raport cu agresiunile externe (Zarnea, 1990).

Sistemul imunitar este constituit – stricto sensu – din celule capabile să interacţioneze specific cu antigenii. Această funcţie este caracteristică pentru două categorii majore de imunocite : limfocitele T – derivate din timus ; limfocitele B – independente de timus. Celulele sistemului imunitar (imunocitele) sunt reprezentate în mare măsură, cca. 98%, de limfocite. In imunologie se menţionează şi existenţa altor celule – de importanţă mai redusă – care dau reacţii de tip imunitar, e.g. : monocite; granulocite, macrofage, celule K (Killer), mastocite, trombocite ş.a.

In imunochimie se menţionează existenţa a şase tipuri de **interleukine (IL)**. Diferenţierile între acestea se fac în raport cu activitatea biologică, studiată îndeosebi in vitro.

Particularităţile activităţii biologice a interleukinelor se pot prezenta, succint, astfel **IL-1** - activează atât limfocitele T în repaus, cât şi celulele endoteliale şi macrofagele, mediază rezistenţa nespecifică la infecţie ; **IL-2** – este factor de creştere pentru limfocitele

T şi activează limfocitele toxice; **IL-3** – se prezintă ca factor de creştere pentru mastocite şi stimulator al creşterii celulelor din măduva osoasă; **IL-4** – este cunoscută ca factor de creştere pentru limfocitele B activate; **IL-5** – constituie un factor de diferenţiere a eozinofilelor şi de stimulare a biosintezei imunoglobulinelor (Ig) de tip IgM şi IgG; **IL-6** – intervine ca factor de stimulare al limfocitelor B şi ca factor de stimulare al hepatocitelor (Darnell et al., 1986; Rawn, 1989; Zarnea, 1990).

Activitatea biologică complexă a diferitelor tipuri de interleukine justifică faptul că sunt considerate "imunohormoni".

Pentru biologia moleculară interleukinele prezintă un interes aparte. Dintre interleukine mai intens au fost studiate tipurile: IL-1 - la care s-au descoperit două subtipuri: IL-1α şi IL-1β (Gery et al., 1972); IL-2 - care prezintă mari diferenţieri moleculare dependente de natura glucidelor constituente ale glicoproteinei (Morgan şi Ruscetti, 1975); IL-3 - la care s-a decelat o masă moleculară mai mare comparativ cu precedenta (Schrader, 1986).

In stare pură s-au obţinut doar IL-2 (Morgan şi Ruscetti, 1975; Frandelizi, 1986) şi IL-3 (Schrader, 1986; Frandelizi, 1986).

Caracterizarea biochimică a acestora a evidenţiat că: IL-2 – este o glicoproteidă cu masă moleculară de 15.500-17.000 Da în care catena polipeptidică are 133 aminoacizi cu secvenţa codificată de o genă de pe cromosomul 4 la om ; Il-3 - este, de asemenea, o glicoproteidă, are masă moleculară de 30.000 Da şi o catenă polipeptidică cu 134 de aminoacizi.

Experimentele cu interleukine au demonstrat rolul acestora în reglarea răspunsului imun, deci calitatea de imunomodulatori. Din acest consdierent s-a ajuns la denumirea de "imunohormoni".

Datele expuse mai sus probează faptul că în biologia moleculară există preocupări pentru obţinerea interleukinelor pe baza tehnologiei DNA recombinant. In practica biotehnologiei se încearcă utilizarea E.coli pentru o astfel de tehnologie.

Ca metodologie s-a procedat iniţial la izolarea mRNA al interleukinei IL-2 din limfocitele T , activate de fitohemaglutinină. Intr-o secundă etapă utilizând ca matriţă mRNA izolat şi folosind reverstranscriptază s-a obţinut cDNA reprezentativ pentru gena interleukinei IL-2. Apoi se parcurg etapele specifice: transformarea, clonarea, amplificarea pentru a obţine produsul final.

Se face precizarea că detaliile operaţionale (tehnica de lucru) privind DNA vector şi DNA pasager sunt patente (secrete) ale unor concerne profilate pe biotehnologii şi evident literatura de specialitate oferă puţine date, datorită caracterului concurenţial sub aspectele tehnologic şi economic.

10.5. OBȚINEREA VACCINURILOR

Problema producerii şi utilizării vaccinurilor constituie unul din obiectivele majore ale medicinei preventive. Vaccinarea împotriva bolilor infecţioase a reprezentat un important mijloc în reducerea morbidităţii şi mortalităţii.

Descoperirea vaccinurilor are origine în observaţiile şi experimentele facute în 1796 de către Jenner în Anglia. Acesta a realizat primele imunizări la om cu puroi recoltat dintr-o pustulă de pe mâna unei mulgătoare. Boala produsă era "variola", la originea acesteia aflându-se virusul variolic. S-a observat apariţia unei forme uşoare la om după contactul cu vaci bolnave de vaccină (variola vacilor). De aici denumirea ulterioară de vaccin (lat. vacca-vacă), dată de Pasteur preparatelor cu efect imunizant atenuat şi de vaccinare dată procedeelor de administrare a vaccinurilor.

In prezent se obţin diverse vaccinuri pe căi considerate convenţionale sau tradiţionale. In funcţie de modul de obţinere se disting, după Aubert-Combiescu (1988), patru categorii de vaccinuri:

1) vaccinuri vii atenuate - realizate prin atenuarea patogenităţii agenţilor virali;
2) vaccinuri inactivate - produse prin suprimarea agenţilor patogeni, dar în condiţiile menţinerii potenţialului de infecţie;
3) vaccinuri subunitare - obţinute prin extragerea unor fracţiuni antigenice din agenţii infecţioşi naturali;
4) anatoxine - compuşi extraşi din toxine elaborate de microorganisme (toxinele nocive pentru om şi animale sunt purificate, concentrate şi dozate).

Dezvoltarea cunoştinţelor referitoare la vaccinuri a condus la apariţia vaccinologiei - considerată în prezent ca un domeniu distinct. In perioada de după 1840 s-a dezvoltat vaccinologia tradiţio+nală. După anul 1975 au început investigaţii în domeniul vaccinologiei moderne bazată pe cunoştinţele din domeniul biologiei moleculare. La aceasta au contribuit cercetările în domeniul tehnologiei DNA recombinant, anticorpilor monoclonali, specificităţii unor gene în raport cu răspunsul imun.

In domeniul producerii vaccinurilor s-a încercat obţinerea de polipeptide sintetice, care să se preteze utilizării practice. Insuficienţa cunoştinţelor privind aspectele particulare ale relaţiei structură chimică-activitate biologică, interacţiile epitopilor şi paratopilor, precum şi complexitatea răspunsului imun, au ridicat dificultăţi insurmontabile în utilizarea polipeptidelor sintetizate ca vaccinuri. In aceste condiţii, polipeptidele preconizate în vederea folosirii ca vaccinuri, nu au depăşit fazele de experimentare pe animale de laborator.

Studiile de biologie moleculară au adus în atenţia imunologiei problema vaccinurilor idiopatice pornind de la aşa numiţii "anticorpi anti-idiotip" notaţi AC2 a căror producere poate fi stimulată de anticorpii care pot actiona ca antigeni numiţi din acest motiv şi anticorpi de ordinul 1 (AC1). Problema devine mai complexă în accepţia faptului că anticorpul AC2 poate la rândul său să se comporte ca un non antigen generând alti anticorpi, i.e. AC3 ş.a.m.d. Astfel s-a născut ideea "reţelei Jerne ", explicitată într-un context cu conotaţie istorică într- un studiu întreprins de Uyt de Haag et al.(1986). In acest context au fost obţinute şi investigate pe animale de laborator vaccinuri idiopatice având ca agenţi infecţioşi virusuri (e.g. hepatita B, rabie, virus Sendai ş.a.), bacterii (e.g. Streptococcus pneumoniae, Listeria monocitogenes) şi chiar paraziţi (e.g. Trypanosoma rhodesiense).

La finele deceniului IX s-au intreprins investigaţii concertate în vederea obţinerii cu ajutorul tehnologiei DNA recombinant a unui vaccin împotriva virusului imunodeficienţei umane HIV. S-au relevat particularităţi ale secvenţelor nucleotidice legate de biogeneza a două tulpini virale HIV1 şi HIV2 (Yokoyama et al., 1988). Hipervariabilitatea genetică creează dificultăţi în stabilirea unor strategii pentru producerea vaccinului. Cercetările au continuat predilect orientate spre izolarea şi caracterizarea anticorpilor din organismul omului şi maimuţelor antropoide, studiul interacţiunilor virus-sistem imunitar în perspectiva aflării unei strategii de aplicarea tehnologiei DNA recombinant.

10.6. INVESTIGAŢII ÎN MEDICINA LEGALĂ

Studiul DNA în medicina legală implică, aşa cum s-a arătat, corelaţia cu filiaţia la nivel de individ raportat la familie.

In medicina legală stabilirea identităţii biologice a indivizilor s-a făcut (şi se face încă) prin aşa numiţii "markeri fenotipici". Intre aceşti markeri se menţionează grupele sanguine (O, A, B, AB) şi factorul Rh, grupele serice (e.g. haptoglobulinele - Hp) şi enzimele eritrocitare. Punerea în evidenţă a markerilor fenotipici se aplică pentru testele de parentalitate (numite uneori eronat "teste de paternitate") şi pentru identificare în criminalistică. Metodele utilizate în medicina legală - sunt considerate ca şi metode de chimie judiciară, pentru considerentul că datele obţinute pot fi utilizate ca probe juridice.

In prezent, în medicina legală, se pot utiliza şi "markeri genotipici" de tipul RFLP bazaţi pe polimorfismul de restricţie. In afară de acesta s-a observat existenţa unui *polimorfism de repetiţie* caracteristic regiunilor hipervariabile ale genomului - constituind aşa numitul **"DNA minisatelit"** - caracteristic fiecărui individ. Acest DNA minisatelit

este răspândit în întreg genomul, iar în cromosomi se află în zonele din proximitatea centromerilor.

In medicina legală, actualmente se utilizează markeri genotipici de tipul RFLP bazaţi pe polimorfismul de restricţie. In afara de acesta s-a observat existenţa unui *polimorfism de repetiţie* caracteristic regiunilor hipervariabile ale genomului - numite regiuni minisatelite. Explorarea acestora se face cu două tipuri de sonde moleculare (pentru DNA): *sonde multi-locus* care conţin scurte secvenţe de "DNA matrice" formate din 10-16 perechi de baze (i.e. nucleobaze): *sonde mono-locus* care pot realiza discriminări ale regiunilor cu DNA minisatelit din genom.

Astfel, prin procedeele descrise se pot obţine veritabile "amprente genetice" (engl. DNA fingerprints; fr. empreintes genetiques).

Cu ajutorul amprentelor genetice se pot soluţiona numeroase probleme de identificare care se impun în medicina legală, e.g.: autentificarea filiaţiei directe (în relaţia parentalitate - descendenţă); autentificarea probelor incriminatorii în criminalistică (în relatia suspect - victimă, care rezidă în identificarea DNA la un suspect şi a "traseelor" de DNA rămase la locul crimei) ş.a. Probele analitice prelevate pot fi reprezentate de: sânge, secreţii, excreţii, radăcina firului de păr, ş.a.

Metodele de investigare discutate mai sus sunt compatibile pentru aplicare şi în domeniul stabilirii pedigreelor. Utilizarea însă, este extrem de costisitoare. Se pretează, de asemenea, aplicării în medicina veterinară şi zootehnie, prezentând interes economic. Studiile în această direcţie sunt însă mai limitate.

10.7. CARTAREA GENOMULUI UMAN

Aprofundarea informaţiilor în domeniul tehnicilor de determinare a secvenţelor din DNA, a facut posibilă - în ultimii 15 ani - aplicarea preceptelor biologiei moleculare la evaluarea aşa numitei "topografii a genelor" din cromosomi. Astfel se menţionează că până spre finele anului 1987 s-a procedat la identificarea şi "cartarea" a cca 750 gene autosomale şi 200 gene X-linked din întregul "pool genic" uman (Papp, 1990).

Pentru studiile de acest fel s-a procedat la definirea simbolurilor regionale din cromosomi (e.g. regiuni p, q şi subregiuni desemnate numeric). După cartarea genelor s-a făcut corelaţia între simbolurile regionale (literal şi numeric) şi afecţiunile corespunzătoare acestora. Acest procedeu a condus la stabilirea de către McKusick în 1980 a ceea ce a numit "anatomia morbidităţii genomului uman". Ulterior a realizat şi un prestigios catalog numeric cu referire la diversele afecţiuni (McKusick, 1980).

Se exemplifică, în acest sens, câteva afecţiuni a căror denumire este inteligibilă fiind la nivelul unor cunoştinte generale din domeniul biochimiei (tabel 10-1). Datele prezentate relevă caracterul specific al investigaţiilor privitoare la "topografia genelor" şi sunt corelate cu stările morbide.

Tabel 10-1. Corelaţia regiune cromosomală - morbiditate (după McKusick, 1980)

Cromosom	Simbol regional	Morbiditate
1	p32	deficienţa galactoz-epimerazei (McK-23 035)
2	p25	deficienţa de hormon ACTH (McK-17 683)
8	p22	hiperlipoproteinemia I (McK-23 860)
X	q28	deficienţa glucozo-6-fosfat-dehidrogenazei (McK-30 590)

Extinderea aplicaţiilor reacţiei în lanţ a polimerazei - PCR (Polymerase Chain Reaction) a permis aprofundarea investigaţiilor asupra secvenţializarii genomului. In afara metodei Maxam şi Gilbert, utilizată în secvenţializare, s-au mai aflat şi alte reacţii specifice nucleobazelor. De asemenea, s-a îmbunătăţit aparatura pentru electroforeză şi utilizarea de filme autoradiografice speciale, fapte care au dus la creşterea rezoluţiei (Gordon et al., 1969; Cohn, 1979; Kaplan şi Delpech, 1990).

In vederea explorării mai riguroase a genomului se studiază posibilităţi noi pentru secvenţializare prin observaţii directe asupra moleculei cu ajutorul microscopiei electronice tip scanning - tunnelling. Mai mult, în prezent se urmăreşte introducerea unor metode care pot asigura automatizarea secvenţializării DNA. In această etapă se apelează la aportul unor domenii care pot conferi interdisciplinaritate cercetărilor, cum ar fi electronica, informatica, robotica.

Pentru investigarea genomului uman, crearea şi extinderea "băncilor de date" necesare informaţiei s-a creat "Organizaţia Genomului Uman" (Human Genome Organisation - HUGO). Aceasta organizaţie a fost concepută ca un for de coordonare internaţională în vederea extinderii cercetărilor asupra genomului.

BCU IASI/CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

11. APLICATII DE INTERES CRONOBIOCHIMIC

11.1. CONSIDERAȚII GENERALE

Metodele de investigare utilizate în biologia moleculară şi în biochimia analitică au permis abordarea cu acurateţe a problemelor referitoare la cronobiochimie şi topobiochimie şi au făcut posibilă acreditarea conceptelor moderne privind "codarea genică" a bioritmurilor. Aceste considerente au impus abordarea cronobiochimică în cadrul problematicii biologiei moleculare.

Interacţiile biochimice ale proceselor metabolice din organism se desfăşoară în timp şi spaţiu urmând "căi biochimice" (i.e. biochemical pathways) specifice, prin care conferă sistemelor biologice posibilitatea de menţinere a unui status morfofiziologic şi biochimic. În acest mod se menţine statusul diverselor funcţii fiziologice (e.g. respiraţia, circulaţia, etc.) şi nivelul relativ constant al diferiţilor metaboliţi (e.g. metaboliţi sanguini: glucoza, lipidele, proteidele, calciul, fosforul etc.).

În realitate s-a putut observa că anumite procese metabolice prezintă alternanţe periodice determinând variaţii ale cuantumului diverşilor metaboliţi cu „timpi în care scad" şi „timpi în care cresc".

Variaţiile biochimice se manifestă de o manieră regulată, periodică şi previzibilă, având trăsăturile unui ritm. Această observaţie a condus la consacrarea noţiunii de „ritm biologic" sau "bioritm" (Halberg şi Reinberg, 1967; Reinberg, 1976; Teodorescu-Exarcu, 1978; Steflea, 1984).

Cronobiochimia se defineşte prin variaţia cuantumului metaboliţilor dată de modificările biochimice, validate statistic, care au un caracter ondulatoriu şi reproductibil în anumite domenii de frecvenţă.

BCU "VICTOR BABEŞ" UNIVERSITY LIBRARY

Modificarea cuantumului metaboliților în timp - sesizată prin mijloacele cronobiochimiei - a condus la conceptul de "structură temporară" acreditat în accepția variațiilor periodice validate statistic. Acest termen, de fapt impropriu, subliniază caracterul ondulatoriu al variației metaboliților şi face trimitere la conceptul de "structură spațială" (sterică) utilizat curent în chimie şi biochimie.

Privită într-un context mai larg, conobiochimia - alături de metabolism, homeostazie şi homeorezie - aparține aşa numitelor caracteristici dinamice ale proceselor metabolice. Aceste caracteristici dinamice concură la definirea particularităților morfofiziologice şi topobiochimice ale diverselor sisteme biologice (Gârban, 1993).

Modificările biochimice care determină cuantumul metaboliților sunt condiționate genetic. Deci, se poate conchide că există o "programare genetică" (sau cu un termen mai uzual o "codare genică") în relație cu cronobiochimia. Evident această observație se poate extinde la toate caracteristicile dinamice ale proceselor biologice. Existența "codării genice" permite explicitarea situațiilor în care specii diferite de animale au ritmuri asemănătoare, fără a fi absolut identice. Deşi există o recunoaştere generală a rolului "codării genice" a bioritmurilor, nu există studii sistematice asupra unor gene specifice în transmiterea acestor caractere.

Totuşi, în ultimele decenii, studii efectuate pe Drosophila melanogaster au evidențiat existența unei gene care influențează ritmul circadian - *gena per*. Această genă s-a dovedit că influențează cuantumul mRNA în cursul unei zile. Astfel se menționează faptul că gena per (period) determină variația nivelului mRNAper în timp de 24 ore, cu un maxim în jurul orei 15 şi un minim în intervalul orar 0-4 (Israil, 2000). De existența genei per se leagă şi sinteza unei proteine PER la nivelul nucleului. Această proteină determină scăderea nivelului mRNAper şi contribuie la limitarea acțiunii genei per (deci un efect inhibitor).

Ulterior, la Drosophila s-a izolat şi o *genă tim* care contribuie la abolirea ritmului biosintezei mRNA. Gena tim se află la originea biosintezei proteinei TIM care contribuie la autoreglarea activității genei tim şi reglarea activității genei per.

Studiile asupra biosintezei mRNAtim au condus la concluzia că proteinele PER şi TIM sunt partenere. Acumularea acestora în nucleu asigură, prin efecte conjugate, funcționarea ritmului circadian şi raportarea coerentă a acestuia la stimuli exteriori (Couderc, 1996 - citat de Israil, 2000).

Cronobiochimia - şi în general cronobiologia - abordează problema rolului ritmurilor biologice (bioritmurilor) şi implicațiilor acestora în integrarea sistemelor biologice. Bioritmurile sunt grevate de modificări biochimice şi fiziologice, variabile în timp.

11.2. BIORITMURILE ŞI BIOLOGIA MOLECULARĂ

11.2.1. PERIODICITATEA BIORITMURILOR

Bioperiodicitatea apare ca un fenomen ubicvitar, care priveşte toate aspectele vieţii. Se distinge astfel o bioperiodicitate morfofiziologică, interesând: interacţiile biochimice - e.g. mediatorii biochimici, variaţiile biofizice - e.g. potenţialul de membrană, procesele fiziologice - e.g. cronotropismul cardiac; modificările morfologice, e.g.: cordul în alternanţa sistolă-diastolă.

Bioritmuri s-au putut decela la diverse nivele de organizare biologică: organism, sisteme de organe, ţesuturi, celule, până la formaţiuni ultrastructurale celulare. Acestea se pot extinde pe un interval de timp extrem de larg, de la 10^{-3} până la 10^{8} secunde. Gruparea acestora se face în: ritmuri cu microintervale - cu perioade de ordinul secundelor sau minutelor; ritmuri cu macrointervale - a căror perioadă este de ordinul orelor, zilelor, lunilor sau anilor.

Clasificarea bioritmurilor se face în funcţie de diverse criterii, între care esenţiale sunt: 1) extinderea în diferite intervale de timp; 2) dependenţa de fenomene astronomice; 3) condiţionarea de statusul fizic şi psihic.

În funcţie de extinderea în timp s-au descris bioritmurile: ultradian, circadian (nictemeral), infradian.

Dependenţa de fenomene astronomice caracterizează bioritmurile cu intervale de timp mari, extinzându-se de la un sezon (estival, hibernal) la intervale multianuale. Între aceste bioritmuri se menţionează bioritmurile: sezonier, anual şi multianual cu durata de 11 ani (solar sau undecaenal).

O caracteristică aparte evidenţiază bioritmurile cu condiţionare fizică şi psihică, denumite adesea "bioritmuri psiho-fizice". Aceste bioritmuri au fost studiate mai detaliat la om şi au fost corelate cu statusul fizic, psihic şi intelectual al acestuia.

În studiile curente de cronobiologie şi cronobiochimie, gruparea bioritmurilor se face predilect în funcţie de intervalul de timp. Astfel s-au decelat ritmuri:

- ***ultradiene*** - care privesc oscilaţiile cu perioade mai scurte: de la câteva fracţiuni de secundă, la minute şi chiar ore;
- ***circadiene*** - a căror durată este de aproximativ 24 ore (în principiu este cuprinsă între 21-28 ore);

BCU "CAROL I" - UNIVERSITY LIBRARY

- ***infradiene*** - la care perioada este de mai multe zile, e.g.: de 7 zile - ritmuri hebdomadare, de aproximativ o lună (ritmuri circamensuale sau selenare), cca un an (ritmuri circanuale), mai mulţi ani (ritmuri multianuale).

O prezentare mai detaliată a acestor clase de bioritmuri se face în Cap. 11.3.

11.2.2. CONDIŢIONAREA BIORITMURILOR

Manifestarea bioritmurilor şi a modificărilor cronobiochimice specifice acestora sunt condiţionate de originea fenomenologică (intrinsecă şi extrinsecă) şi sunt dependente de procesele metabolice.

Condiţionarea, prin origine, relevă faptul că bioritmurile prezintă o *componentă intrinsecă* - determinată de factori interni înscrişi în programul genetic al organismului şi transmişi ereditar (e.g. activitatea cordului, ciclul estral ş.a.) şi o *componentă extrinsecă* - determinată de factori de mediu, e.g. termoreglarea, diureza etc. - majoritatea cu determinismul zi-noapte (deci cu specificul de bioritm circadian).

Componenta intrinsecă - numită adesea şi "endogenă" - atestă faptul că un anumit bioritm înnăscut este prezent în codul genetic al organismului şi se transmite de la o generaţie la alta. În acest caz se acceptă - ino tempore - şi existenţă unei transmiteri a acestuia în succesiunea proceselor de replicaţie-transcripţie-translaţie. Astfel, de la DNA genomic informaţia biologică este transmisă până la proteine. Proteinele implicate în menţinerea bioritmurilor influenţează ritmicitatea proceselor biologice.

Studiile în acest domeniu al biologiei moleculare sunt tot mai numeroase, în ultimele două decenii fiind orientate predilect spre anumite corelaţii existente între ultrastructura celulară şi procesele fiziologice, e.g. stresul oxidativ în relaţie cu DNA, efectele induse de xenobiotice etc. (Laganiere, 1989; Holmes et al., 1992; Kristal şi Yu, 1992). De asemenea, au fost investigate detalii care vizează ultrastructura mitocondrială şi procesul de senescenţă, e.g. cracteristicile electronomicroscopice şi aspectele topobiochimice ale DNA mitocondrial notat uzual mt-DNA (Hayashi et al., 1994; Katsumata, 1994).

Componenta extrinsecă - numită şi "exogenă" - este dependentă de factori ambientali, e.g. temperatură, umiditate, presiune atmosferică, pragul de iradiere etc. Aceşti factori pot influenţa în măsură mare bioritmurile şi îndeosebi periodicitatea acestora. Sunt cunoscute în acest sens efectele stresului termic atât în regnul vegetal cât şi în regnul animal, efectele stresului hidric şi ale stresului baric (determinat de modificările de presiune atmosferică). Efectele enumerate sunt cunoscute şi tot mai frecvent

studiate în fiziologie şi fiziopatologie (e.g. afecțiuni respiratorii, afecțiuni cardiovasculare etc).

Condiționarea bioritmurilor de componenta extrinsecă este, într-o oarecare măsură, influențabilă de către om prin intervențiile (posibile în parte) asupra ambientului.

Aşa cum s-a menționat, modificările cronobiochimice sunt dependente şi de procesele metabolice. Aceste procese sunt definite prin interacțiile biochimice cata- şi anabolice, care - în ultima instanță - sunt condiționate de componenetele intrinsecă şi extrinsecă.

11.3. PRINCIPALELE TIPURI DE BIORITMURI

11.3.1. BIORITMURILE ULTRADIENE

Estimându-se bioritmurile unor procese fiziologice - la baza cărora stau mecanismele biochimice şi biofizice - se remarcă o mare variație a periodicității acestora. Astfel, s-a constatat că la om periodicitatea bioritmurilor ultradiene (exprimată în secunde) este: în procesele neuronale 10^{-3}-10^{0} s (e.g. la encefalogramă 10^{-2} s); în mişcările respiratorii cca. $0{,}27.10^{0}$ s; în mişcările peristaltice 10^{1} s; în circulația sanguină 10^{1} - $10^{2,5}$ s.

Din mențiunile de mai sus se poate constata că bioritmurile ultradiene au la origine interacțiile biochimice care au loc în organism şi caraterizează prin excelență procesele fiziologice din sistemul nervos, aparatul respirator, digestiv şi circulator.

11.3.2. BIORITMURILE CIRCADIENE

Bioritmurile circadiene, comparativ cu alte clase de bioritmuri, sunt mai numeroase atât la om cât şi la animale sau chiar la plante.

În general, se estimează că bioritmurile circadiene numite şi nictemerale sau zilnice, au durată de circa 24 ore. Limitele acestora - având în vedere decalajul de fază - sunt cuprinse în intervale de 21 - 28 ore. Aceste variații se datorează „individualității biochimice", inclusă sub forma unui program în patrimoniul genetic al fiecărui organism. Calcule matematice care au urmărit exprimarea periodicității tirmurilor circadiene în secunde au condus la concluzia că durata medie a acestora este de cca. $0{,}864 . 10^{0}$ s.

In regnul animal variațiile cronobiochimice circadiene privite în relație cu metabolismul relevă faptul că, noaptea este dominată de anabolism, iar ziua de catabolism. Privite în ansamblu - în cadrul bioritmului circadian - se remarcă o exacerbare

matinală şi o remisiune vesperală a unor parametri fiziologici (e.g. temperatură corporală) şi biochimici (e.g. cuantumul nucleoproteidelor).

Spre exemplu, biosinteza DNA evidenţiază un ritm circadian cu însemnate modificări. Investigaţii de cronobiochimie întreprinse de Mayersbach (1977) prin determinări ale DNA hepatic efectuate la animale de laborator (şobolani), cu intermitenţă de 2 ore, au relevat existenţa unui maxim în cursul dimineţii în jurul orei 8 şi al doilea maxim situat între orele 0-2. În fig. 11-1 se redau după Mayersbach (1977) diagramele variaţiei circadiene a concentraţiei DNA hepatic în două luni diferite (martie şi iulie). Estimarea datelor s-a făcut în raport cu o mărime relativă (adimensională) reprezentând media valorilor determinate.

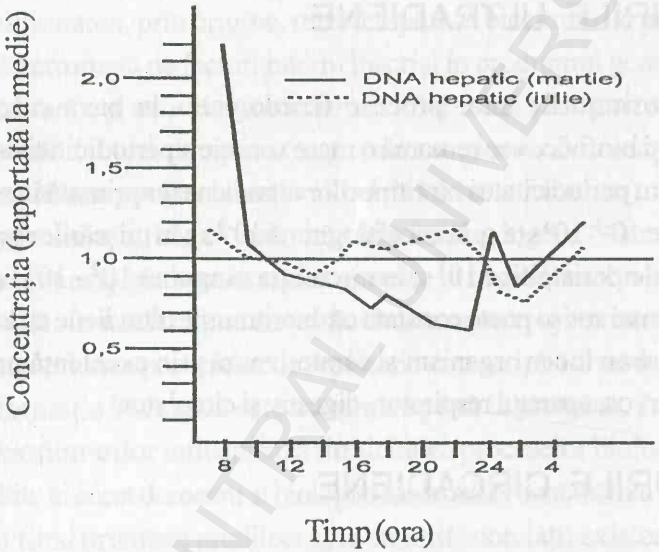


Fig.11.1. Fluctuaţiile circadiene ale DNA la şobolan

În afara variaţiilor circadiene ale cuantumului acidului deoxiribonucleici Mayersbach a sesizat şi prezenţa unor inflexiuni sezoniere caracteristice. Autorul remarcă faptul că valorile normale atinse la anumite ore, în cadrul fluctuaţiei circadiene, nu pot fi obţinute uneori nici prin intervenţii experimentale.

Privitor la fazele duale catabolism-anabolism în relaţia zi-noapte, se menţionează că de la această corelare fac excepţie animalele a căror activitate se desfăşoară noaptea e.g. : şoarecele de câmp, şarpele, liliacul etc.

Studii de endocrinologie au arătat că la om există modificări cronobiochimice specifice bioritmului circadian ale căror intensitate creşte în perioada nocturnă, e.g.: biogeneza hormonului de creştere, a prolactinei şi melatoninei.

Studiile de cronobiochimie efectuate de Reinberg (1973), asupra unor parametri specifici metabolismului material (e.g. metaboliți serici și urinari) au relevat modificările notabile în alternanța zi/ noapte, remarcându-se existența unor valori maxime (acrofaza) diferite de la caz la caz, în cadrul a 24 de ore - tabel 11-1.

Tabel 11-1. Variațiile cronobiochimice circadiene ale unor metaboliți la om

Specificare	Tip de variabilitate	Acrofaza maxim
Sânge	Ca^{2+}	
	Na^+	
	K^+ eritrocitar	
	HCO^{3-}	
Plasm sau ser	Ca^{2+}	
	Na^+	
Urin	Ca^{2+}	
	Mg^{2+}	
	Na^+	
	K^+	
	Na/K	
	PO_4^{3-}	
Periodicitatea		ziua — 24 ore — noaptea

Există și în regnul vegetal procese care evidențiază variații cu caracter periodic, însă au fost mai puțin studiate. Un exermplu concludent al bioritmului circadian este reprezentat de procesele *de fotosinteză* și *retenția de azot*. Interesant de remarcat este faptul că intenstiatea acestor procese are caracter antitetic și este menținut de alternanța zi/noapte.

Fotosinteza - așa cum se cunoaște - constituie procesul de formare a materiei vii în prezența luminii.

BCU "SIMION BĂRNUȚIU" CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Retenţia de azot - se realizează în cursul nopţii (în absenţa luminii). Procesele de biosinteză urmate de fixarea azotului - studiate în special la cianobacterii - sunt inactivate de prezenţa oxigenului care este eliberat în cursul fotosintezei.

11.3.3. BIORITMURILE INFRADIENE

Aşa cum s-a arătat, bioritmurile infradiene au perioade mai mari şi sunt caracteristice ritmurile heptomadare, circamensuale, sezoniere, anuale şi multianuale. O succintă prezentare a acestora se face în continuare.

Bioritmul hebdomadar. Este cunoscut şi sub denumirea de bioritm "săptămânal". Caracteristicile acestui bioritm au fost studiate mai mult în ultimele trei decenii. Bioritmul este corelat cu perioada de activitate profesională a omului şi respectiv perioada de odihnă. Interesante constatări s-au efectuat asupra bioritmului hebdomadar şi variaţia statusului unor parametri biochimici sanguini (glicemia, lipemia, bioelectroliţii etc.). De asemenea, s-au observat modificări ale statusului hormonal şi variaţii ale cuantumului unor mediatori chimici ai influxului nervos.

Bioritmul circamensual. Are şi denumirile de bioritm "lunar" sau "selenar". Acest bioritm este bine studiat la femeie, corelându-se cu "ciclul estral" (în medie 28 zile), abordat fiind mai detaliat în tratatele de fiziologie şi endocrinologie. Remarcabil este faptul că s-a găsit şi la bărbat un "bioritm cvasimensual" şi acesta legat de excreţia hormonului tiroidian T_3 (trit) cu o periodicitate de cca. 29 zile şi 5 ore. Bioritmurile mensuale nu au o delimitare temporală strictă existând variaţii de ordinul a cca. 2 zile, condiţionate de regimul de activitate, fenomene geomagnetice etc.

Bioritmul sezonier. Are o condiţionare atât intrinsecă (ereditară) cât şi extrinsecă. În regnul animal, condiţionarea extrinsecă se poate exemplifica prin hibernarea la animale – cu reducerea funcţiilor metabolice şi a temperaturii corpului etc., în perioada toamnă-iarnă şi reluarea activităţii în perioada primăvară-vară. Similar, în regnul vegetal se poate exemplifica existenţa bioritmului sezonier prin existenţa fenofazelor la plante (creştere, dezvoltare, maturare, producere de seminţe – în perioada de primăvară-vară – şi conservarea atributelor morfofuncţionale ale seminţelor – în perioada de iarnă). În acest ciclu se înscrie şi migraţia păsărilor, care are o condiţionare sezonieră în relaţie cu anotimpul. Condiţionarea extrinsecă a acestui bioritm este dependentă de factori ai arealului existenţial.

Bioritmul anual. Are o condiţionare intrinsecă fiind înscrisă în "programul genetic" al fiecărui organism (aşa numita "codare genică"). Pentru regnul animal, un

exemplu tipic de bioritm anual este reproducerea la unele animale sălbatice, la care naşterea puilor are loc într-o anumită perioadă limitată la cca. o lună din cursul anului. Acest bioritm este caracteristic şi pentru regnul vegetal, cunoscându-se faptul că există plante anuale şi multianuale în funcţie de modul de producere a seminţelor. La om, bioritmul anual a fost studiat îndeosebi din punct de vedere al endocrinologei, constatându-se că există un status crescut al cuantumului hormonilor androgeni şi estrogeni în perioada de vară-toamnă, fapt confirmat şi de statisticile biomedicale care atestă creşterea natalităţii în relaţie cu perioadele hiperfuncţiei endocrine gonadale.

Bioritmul multianual. Este, în general, mai puţin cunoscut, deoarece există un număr mai redus de studii în acest sens. Totuşi, se cunoaşte faptul că în funcţie de activitatea solară – care are o periodicitate de 11 ani – există modificări cronobiochimice ale metaboliţilor sanguini, ale compoziţiei lichidelor biologice şi modificări hematologice - caracterizate prin depresia numărului de leucocite. Este interesat de remarcat că acest bioritm este corelat cu creşterea incidenţei bolilor infecţioase, a bolilor neuropsihice, a accidentelor vasculare (infarcte, embolii), a cazurilor de hipertensiune arterială.

Se menţionează faptul că bioritmul multianual influenţează concomitent şi celelalte bioritmuri prin anvergura fenomenelor cosmice, a creşterii pragului radiaţiilor cosmice, a efectelor magnetice etc.

Un calcul asupra duratei unor bioritmuri infradiene, efectuat în secunde - procedeu aplicat pentru a fi posibilă compararea - arată că ritmurile selenare au durata de $2{,}593 \cdot 10^6$ s, iar ritmurile circanuale de $3 \cdot 10^7$ s.

Bioritmologia relevă, de asemenea, modificări importante şi în cursul ontogenezei. În acest sens se exemplifică modificările cronobiochimice de interes endocrinologic ale hormonilor steroizi cu diferenţe importante din perioadele juvenilă, adultă şi de senescenţă. Abordarea problemelor de biochimie şi biologie moleculară a sistemului endocrin la om au relevat şi rolul gonosomilor (cromosomi specifici sexului), la femeie XX şi la bărbat XY. S-au remarcat la femeie modificări în jurul vârstei de 45-50 ani, iar la bărbat la 55-60 ani.

În general, în legătură cu sistemul endocrin şi senescenţa se afirmă că hormonii nu provoacă dar participă la procesul de senescenţă. Această afirmaţie se corelează cu faptul că hormonii estrogeni (feminini) şi androgeni (masculini) nu sunt doar hormoni sexuali, sunt şi hormoni anabolici.

11.4. PARAMETRI CRONOBIOCHIMICI SPECIFICI RITMURILOR BIOLOGICE

Diverse aspecte cronobiologice sunt bine cunoscute, e.g. ritmul cardiac şi respirator, ritmul veghe-somn, ciclul menstrual la femeie (cu modificările hormonale specifice), ciclurile proceselor de reproducere la animale şi plante.

În unele cazuri se cunosc bine şi variaţiile cronobiochimice, e.g. statusul hormonal, cuantumul electroliţilor. În alte cazuri informaţiile asupra variaţiilor cronobiochimice sunt relativ restrânse, cercetări mai importante apărând în ultimul deceniu, e.g. neurotransmiţători.

O variaţie ciclică, regulată - specifică ritmurilor biologice - poate fi asimilată unei funcţii sinusoidale, ceea ce permite o abordare matematică. Astfel este posibilă cercetarea funcţiei sinusoidale a unor mărimi (i.e. valori cronobiochimice) determinate experimental într-o serie temporală pentru a permite estimarea unor parametrii şi chiar evaluarea biostatistică a acestora.

În acest context, Halberg (1980) relevă existenţa unor aşa numiţi parametri caracteristici pentru fiecare bioritm. Definirea parametrilor caracteristici pentru modificările cronobiochimice are o importanţă esenţială, între aceştia exemplificându-se modificările circadiene (fig.11-2).

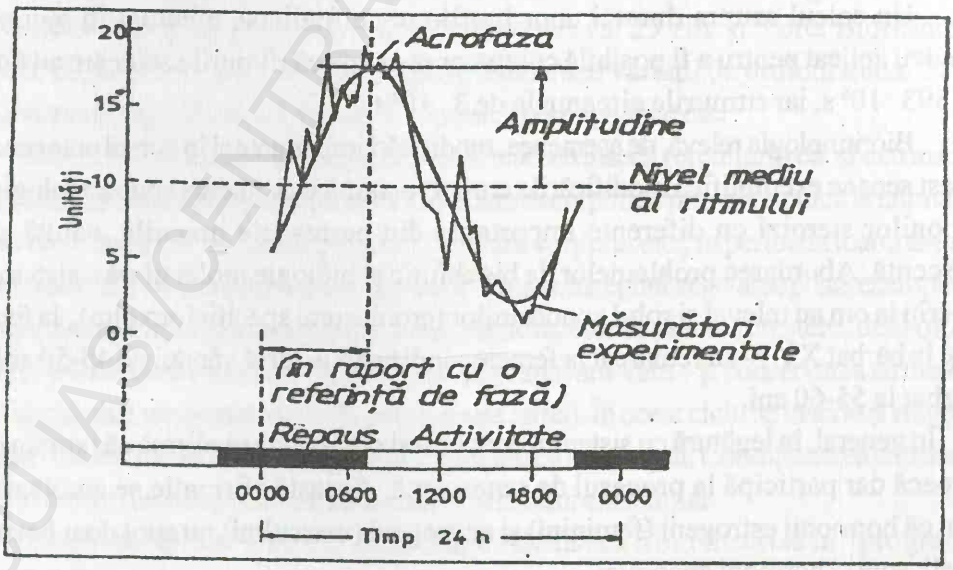


Fig. 11-2. Modificări cronobiologice circadiene (explicaţii în text)

Definirea acestora se prezintă în continuare:

- **perioada** - caracterizează durata unui ciclu complet de variație;
- **acrofaza** - corespunde unui vârf maxim (pic) al mărimii cronobiochimice în perioada considerată. Aceasta este redată uzual în unități de timp (ore, minute...) sau de greutate (mg, μg...) în raport cu o fază de referință aleasă arbitrar (e.g. ora locală pentru variațiile ritmice zilnice).
- **amplitudinea** - se definește prin jumătatea variației totale a unei mărimi cronobiochimice (luată în studiu) pentru o perioadă considerată. În ansamblu, există o variație a funcției, care se realizează de o parte și alta a unui nivel al ritmului. Trasarea curbei sinusoidale - specifice bioritmului - se realizează integrativ pe baza măsurătorilor experimentale.

Efectele modificărilor cronobiochimice nu se limitează doar la variații circadiene, extinzându-se și la nivel selenar (îndeosebi sub aspect endocrin) și chiar la nivel sezonier (sesizabilă mai ușor la nivelul electroliților). Astfel, spre exemplu, în metabolismul hidroelectrolitic s-a constatat că apa - mediul tuturor reacțiilor biochimice (moleculare și ionice) - prezintă la om și animale o excreție crescută vara, când volumul total al sângelui circulant înregistrează o maximă și o excreție mai scăzută iarna. Aceasta afectează hemoconcentrația influențând, într-o anumită măsură, conținutul în electroliți, precum și valoarea unor parametri hematologici. Excreția evidențiază cele mai reduse valori iarna, prezentând două maxime: septembrie - octombrie (ora 8-12) și martie - aprilie (ora 16-20).

Concentrația electroliților în lichidele biologice marchează, de asemenea, variații circanuale. Astfel, s-a constatat că maximul excreției pentru K^+ se realizează primăvara, iar pentru Cl^- se produce vara. Variații importante marchează și I^- seric, înregistrându-se un maxim vara și un minim iarna. Marcante variații sezoniere au fost sesizate la Ca^{2+}: calcemia evidențiază un maxim în luna august, iar apoi după o regresie continuă ajunge la un minim în februarie-martie. O variație similară evidențiază și Mg^{2+}. Variația concentrației acestor ioni se exteriorizează prin creșterea excitabilității neuro-musculare, apariția fenomenelor de tetanie latentă sau cronică (spasmofilie) etc.

11.5. AUTONOMIA ȘI SINCRONIZAREA BIORITMURILOR

Bioperiodicitatea se prezintă ca un fenomen propriu organismelor. Aceasta are o componentă endogenă (genetică), aflată la originea "*autonomiei*" bioritmurilor. Există însă și posibilitatea de "*sincronizare*" în raport cu arealul existențial. Acest aspect tributar factorilor exogeni - a fost studiat mai mult la bioritmurile circadiene.

11.5.1. AUTONOMIA BIORITMURILOR

Chestiunea *autonomiei bioritmurilor* poate fi discutată în relaţie cu existenţa unei "programări genetice". Deci prezintă origine endogenă. Factorul genetic explică atât modificările cronobiochimice calitative şi/sau cantitative ale unor efectori biochimici intrinseci (e.g. hormoni, electroliţi) cât şi existenţa unui biofeed-back în sistemul neuroendocrin - problemă abordată mai mult în fiziologie şi neurobiochimie.

Pentru a înţelege aspectul de autonomie în relaţie cu cronobiochimia, se apelează la un exemplu simplu, uşor inteligibil, referitor la hormonii steroizi în cadrul "ciclului estral" la femeie (circa 28 zile). Se remarcă în prima fază a ciclului estral - faza foliculară (proliferativă), existenţa unui cuantum mai mare de hormoni estrogeni - însoţind dezvoltarea ovulelor în foliculul de Graaf din ovar. În faza secundă, subsecventă, a ciclului estral - faza luteală (secretorie), are loc biosinteza de progesteronă produsă la nivelul corpului galben (corpus luteum) din ovar. Aceste date relevă modificările calitative ale hormonilor steroizi în relaţie cu ciclul estral.

Un aspect mai puţin cunoscut al autonomiei bioritmurilor este legat de "bioritmurile psiho-fizice". În acest sens studiile intreprinse evidenţiază la om existenţa a trei bioritmuri caracteristice:

a) *Bioritmul fizic* - cu durata de 23 zile. Acest bioritm cuprinde, de fapt, două etape circumscrise fiecare la un număr de 11 zile şi 12 ore. Prima etapă se caracterizează printr-o vigoare crescută şi aptitudini marcate pentru activităţi fizice dată fiind o rezistenţă crescută a organismului la eforturi fizice; secunda etapă, cu durată identică, este caracterizată printr-o remisiune a capacităţii fizice cu starea de oboseală.

b) *Bioritmul emoţional* - se extinde pe o durată de 28 zile. Şi în cazul acestui bioritm se disting două etape cu durata de 14 zile fecare. Prima etapă se caracterizeză printr-o stare tonică şi o atitudine calmă; secunda etapă este marcată de stări de nervozitate şi chiar irascibilitate.

c) *Bioritmul intelectual* - cu durata de 33 zile. Este caracterizat, de asemenea, prin existenţe a două faze distincte cu durata de 16 zile şi 12 ore fiecare: prima fază este definită prin activitate cerebrală mai intensă, capacitate crescută de memorare, spontaneitate; secunda fază se caracterizează prin reducerea capacităţii de concentrare asupra subiectelor abordate, cresterea "comutabilităţii atenţiei" (în psihologie, studiindu-se adesea acest aspect în relaţie cu posibilitatea de menţinere a atenţiei asupra unui subiect, s-a constatat că aceasta este maxim 2-7 minute).

Referitor la bioritmurile psiho-fizice s-au făcut diverse studii interesând activitatea personalului aero-navigant, activitatea şoferilor şi măsurile conexe de prevenire a accidentelor. Aceste aspecte au fost corelate cu bioritmul fizic şi emoțional. De asemenea, s-au efectuat studii de interes biomedical, urmărind practica chirurgicală în relație cu bioritmul fizic. În domeniul medicinei legale s-au efectuat investigații cu caracter ştiințific asupra frecvenței deceselor remarcându-se că acestea survin îndeosebi în fazele negative ale bioritmurilor psiho-fizice.

S-au făcut importante observații la baza cărora au stat "bioritmogramele" elaborate cu ajutorul calculatorului şi care au urmărit evoluția în paralel a tuturor bioritmurilor psiho-fizice. În acest context au fost efectuate recomandări în funcție de scopul urmărit şi s-a conchis că există aşa-numitele "zile critice" în cazurile în care se produce tranziția de la faza pozitivă la cea negativă a unui bioritm şi în cazul a două bioritmuri negative (afirmația are în vedere faptul că fiecare dintre bioritmurile menționate se poate înscrie într-o sinusoidă cu durata specifică).

11.5.2. SINCRONIZAREA BIORITMURILOR

Problema *sincronizării* bioritmurilor relevă că organismul are capacitatea de a-şi ajusta ritmul (e.g. procesele metabolice) în funcție de periodicitatea exterioară utilizând diverse semnale din mediu. Astfel, spre exemplu, variațiile intensității luminoase (noapte, zi, lumina crepusculară); variațiile temperaturii (naturale sau artificiale); modificările de presiune (aşa numitele "variații barice"); modificările nivelului zgomotelor etc, pot reprezenta factori de mediu externi cu rol de stimuli.

Factorii de mediu extern, naturali sau artificiali, care acționează asupra unui bioritm sunt denumiți cu un termen generic *sincronizatori* (fr. donneur de temps; germ. Zeitgeber).

O privire de ansamblu asupra sincronizatorilor indică faptul că aceştia sunt factori ambientali - externi, care intervin în menținerea sau modificarea proceselor cronobiologice şi implicit a substratului acestora: variația unor parametri cronobiochimici (e.g. modificarea cuantumului melatoninei şi a activității secretorii a glandei epifize în relație cu stările de veghe/somn).

Între sincronizatori se includ:

a) factori fizici, e.g.: alternanța lumină / întuneric (cu posibila intervenție a luminii artificiale), fluctuațiile de temperatură, de umiditate;

b) factori chimici, e.g.: programul de hrănire a animalelor, administrarea de îngrăşăminte şi apă (irigare) la plante;

c) factori biologici, e.g.: integrarea speciilor într-un anumit ecosistem;

d) factori sociali, e.g.: alternanţa perioadelor de activitate (fizică, intelectuală) cu perioadele de odihnă;

e) factori geofizici, e.g.: dependenţi de ionizarea atmosferică; mişcarea de rotaţie a pământului, mişcarea de revoluţie a Terrei în jurul Soarelui, etc.

Sincronizatorii pot fi manipulaţi sub raportul duratei de acţiune necesară ajustării bioritmului (i.e. sincronizării). Spre exemplu, ciclul lumină-întuneric, temperatura ambientală pot fi modificate în cadrul bioritmului circadian. De asemenea, sincronizatorii pot interveni în modificarea fazelor şi îndeosebi a acrofazei ritmului circadian.

În existenţa omului, spre exemplu, este importantă problema sincronizării circadiene a manifestărilor cronobiologice (şi evident a substratului cronobiochimic al acestora). Se menţionează în acest sens deplasările transmeridiane, cum ar fi: voiajul cu avionul prin depăşirea a numeroase fuse orare, schimbarea orarului de muncă (ore alternante zi/ noapte) şi chiar schimbarea orei oficiale (tranzitul de la iarnă la vară şi invers). În acest context se poate vorbi şi de o componentă socio-ecologică a bioperiodicităţii. În astfel de situaţii intervin modificări ale mai multor parametri biochimici. Dintre acestea vom menţiona doar melatonina - hormonul epifizar (un parametru biochimic mai puţin studiat) care intervine predilect în modificarea bioritmului veghe-somn.

Sincronizarea este importantă atât în regnul animal (e.g. migraţia păsărilor, păstoritul prin transhumanţă) cât şi vegetal (e.g. procesul de fotosinteză în cadrul ciclului diurn ş.a.).

Sub aspect cronobiochimic sincronizarea se corelează cu modificări în metabolismele materiale (protidic, lipidic, glucidic, hidroelectrolitic) şi metabolismul energetic. Astfel, cromoproteidele (hemoglobina la animale, clorofila la plante); nucleoproteidele (îndeosebi acizii nucleici DNA şi RNA); lipidele (glicerofosfolipide, steride); glucidele (glicogen - la animale; celuloza, amidonul - la plante) relevă importante modificări în timp.

De exemplu, observaţia că DNA hepatic are cuantum mai crescut matinal (Mayersbach, 1977; Gârban, 1989) poate dobândi aplicaţii în chimioterapia bazată pe cronofarmacologie, în sensul "sincronizării" chimioterapiei cu modificările cronobiochimice ale DNA tisular (e.g. DNA hepatic).

Un aspect particular al sincronizării este reprezentat de investigaţiile care urmăresc "sincronizarea ciclului celular" la eucariote. Astfel de studii s-au intreprins pentru evaluarea efectelor terapiei citostatice în corelaţie cu etapa de sinteză a DNA în cadrul ciclului celular.

Privit într-un context mai larg, studiul problemelor de cronobiologie - cu fundamentul acestora cronobiochimia - a făcut posibilă constatarea că bioritmurile sunt consecința proceselor existente la nivelul celulelor, țesuturilor, organelor, sistemelor de organe sau chiar a populațiilor (spre exemplu, migrarea la păsări, hibernarea la mamifere).

Extinderea studiilor de cronobiochimie la om și animale a condus la elucidarea a numeroase probleme și conexiuni interdisciplinare, determinând apariția și circumscrierea unor noi domenii, cum ar fi: cronofiziologia, cronopatologia, cronofarmacologia, cronotoxicologia.

Existența ritmurilor biologice, ca expresie a mișcărilor periodice la/și din organisme, a permis compararea - la scară universală - cu periodicitatea mișcărilor caracteristice, atât macrocosmosului (galaxiile) cât și microcosmosului (nucleul atomic).

11.6. IMPLICAȚII ALE BIOLOGIEI MOLECULARE ȘI CRONOBIOCHIMIEI ÎN SENESCENȚĂ

Abordarea problemelor senescenței pornind de la aspecte specifice biologiei moleculare și celulare, precum și a cronobiochimiei, a făcut posibilă decelarea unor modificări care afectează nucleul celular, structurile cromosomale și induc injurii la nivelul acizilor nucleici din celulele senescente.

Investigațiile referitoare la ultrastructura celulelor, a topobiochimiei și a homeostaziei biochimice extinse asupra perioadei de senescență au revelat schimbări la nivelul constituenților celulari și al metaboliților.

Privite din punct de vedere al biologiei celulare și moleculare, problemele legate de senescență au fost abordate în cadrul gerontologiei, creându-se astfel un domeniu special - al citogerontologiei (Hayflick, 1983) care a permis sistematizarea diverselor teorii (Medvedev, 1990). Între aceste teorii, majoritatea interesând biosinteza macromoleculelor, Eremia (1996) distinge:

1. Teorii ale programării genetice – care apelează la diverse ipoteze între care: existența unui program activ morfogenetic; existența unor gene specifice sau nespecifice pentru senescență etc.
2. Teorii ale leziunilor primare – care s-au emis în accepția unor ipoteze privind: uzura funcțională; autointoxicația; diminuarea gradului de coordonare între căile metabolice; formarea radicalilor liberi; acumularea deuteriului; acțiunea radiațiilor; efectul stresului etc.

BCU "IOSIF VULCAN" UNIVERSITY LIBRARY

3. Teorii bazate pe analiza manifestărilor la nivel molecular, celular şi organic – în cadrul acestora apelându-se la rezultatele unor studii privind: stabilitatea structurală a metaboliţilor; modificări calitative ale proteinelor de sorginte posttranscrtipţională; schimbări ale cuantumului proteinelor; modificări ale structurii acizilor nucleici (îndeosebi ale DNA) etc.
4. Teorii evoluţioniste – în cadrul cărora se fac corelaţii privind: rata creşterii şi rata îmbătrânirii; rata dezvoltării şi rata îmbătrânirii; modificări la nivel molecular (interesând îndeosebi sinteza macromoleculelor) şi durata vieţii; modificări la nivel genetic şi rata îmbătrânirii etc.
5. Teorii limitate la evoluţia anumitor ţesuturi – care fac referire la: rolul colesterolului în ateroscleroză; modificarea proteinelor în îmbătrânirea cristalinului; involuţia în timp a eritrocitelor etc.
6. Teorii bazate pe modele fizico-matematice – prin care se procedează la: evaluarea efectelor induse de radiaţii; modalităţi de interpretare cibernetică a evoluţiei proceselor de senescenţă etc.
7. Teorii unificatoare – în care se încearcă asocierea divereselor grupuri de teorii pornind de la considerente teoretice, e.g.: asocierea teoriei erorilor cu teoria radicalilor liberi (Kowald şi Kirkwood, 1994 – citaţi de Eremia, 1996).

In general, despre procesele de senescenţă, se poate afirma că sunt fenomene cu o cauzalitate multiplă la care concură diverşi factori de natură biofizică, biochimică şi biologică. Majoritatea studiilor în domeniul senescenţei tind spre considerarea existenţei unor cauze fizico-chimice care sunt inevitabile şi universale. In accepţia existenţei unei programări genetice, se consideră că aceasta poate limita, într-o anumită măsură, desfăşurarea multitudinii de procese care conduc spre avansarea senescenţei, fără însă a fi posibilă evitarea acestora.

Modificările specifice senescenţei afectează nucleul celular, membrana celulară, dar şi organitele celulare, predilect mitocondriile, lizosomii şi peroxisomii.

La nivelul *nucleului celular* se produc modificări ale cromatinei, estimându-se că acestea vizează atât DNA cromosomal cât şi proteinele cromatidice.

Injuriile care afectează DNA constau în: dimerizări ale unor perechi de nucleobaze de pe aceiaşi catenă sau de pe catena complementară; fragmentări uni- sau dicatenare; rearanjări ale materialului genetic; transpoziţii ale unor fragmente de DNA etc. (Holmes et al., 1992; Haley-Zitlin şi Richardson, 1994; Katsumata et al., 1994).

Observaţii remarcabile au fost efectuate asupra DNA cromosomal. În acest sens se menţionează decelarea unor fragmente de DNA coreal (provenit de la virusuri), de

DNA plasmidal (provenind de la plasmide din unele celule procariotice) şi chiar DNA mitocondrial (mt-DNA) provenind din aceeaşi celulă.

Ca o notă generală, având în vedere faptul că acesta se discută în raport cu senescența, este important de remarcat că modificările descrise au caracter cumulativ, cuantumul acestora crescând cu înaintarea în timp. Toate leziunile induse la nivel DNA au drept consecință reducerea capacității DNA omolog de a participa la desfăşurarea coerentă, succesivă a proceselor de replicație - transcripție - translație specifice sintezei proteice (Fodor, 1969; Eichhorn, 1973; Grunberger şi Weinstein, 1979; Dyer, 1993) .

Constatările privind modificările la nivelul *membranelor celulare* au arătat că evoluția acestora este marcată de creşterea concentrației colesterolului şi a acizilor graşi saturați în lipidele din membrană. De asemenea, lipidele membranare evidențiază în senescență o creştere a capacității de peroxidare. Proteinele constituente ale membranei lipoproteice pot, de asemenea, evidenția modificări explicitate prin angajarea grupărilor funcționale carboxilice, aminice, hidroxilice şi tiolice în legături intercatenare, intersând alte proteine sau chiar lipoproteine.

In cazul *mitocondriilor*, modificările afectează membrana mitocondrială dar şi DNA mitocondrial. Modificările la nivelul mt-DNA – macromoleculă cu formă circulară – se datorează predilect radicalilor liberi prezenți în sistem, în proximitatea membranelor mitocondriale. Evoluția leziunilor mt-DNA este facilitată şi de faptul că în cazul acestuia (spre deosebire de DNA cromosomal din nucleu) nu există mecanisme de excizie, de reparare şi de recombinare (Gadaleta et al., 1992). Procesele de senescență au fost asociate, de asemenea, depresiei activității enzimelor mitocondriale, e.g.: NADH-citocrom-reductaza.

Modificările *lizosomilor* sunt importante pentru faptul că activitatea acestora este legată de funcționalitatea enzimelor hidrolitice care concură la desfăşurarea proceselor specifice nutriției celulare, dar şi la procesele de autoliză interesând "detritusurile"din celulă.

Cu privire la *peroxisomi* se reamintește rolul important al acestora în biodegradarea nucleobazelor purinice; participarea la oxidarea acizilor graşi pe calea beta oxidării – implicată în metabolismul coenzimelor etc. Modificările peroxisomale afectează sistemul peroxisomal de oxidare enzimatică - PEOS (peroxisomal enzymatic oxidyzing system).

Având în vedere unele aspecte referitoare la biochimia anorganică şi patobiochimică conexă acesteia, se fac unele referiri şi la rolul metalelor în senescență. Este cunoscut faptul

că metalele participă la procesele redox prin schimburile electronice corespunzătoare, oxidarea semnificând cedare de electroni, iar reducerea acceptare de electroni.

În general, modificările induse la nivel celular se extind şi asupra altor organite precum şi asupra citoscheletului şi matricei extracelulare. Aceste modificări vizează diversii metaboliţi atât calitativ (specii moleculare de proteine, glicoproteine, lipide) cât şi cantitativ - evidenţiind schimbări ale cuantumului acestora.

BCU IASI/CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

12. APLICATII ÎN STUDIUL XENOBIOTICELOR

12.1. CONSIDERAȚII GENERALE

Problemele referitoare la aplicațiile biologiei moleculare în studiul xenobioticelor interesează nutriția, farmacologia şi cosmetica în relație cu patologia biochimică (patobiochimia). În acest context, se are în vedere faptul că diverşi compuşi chimici denumiți cu un termen generic "substanțe xenobiotice" sau simplu "xenobiotice" (gr. xenos-străin; bios-viață) însoțesc nutrienții din alimente ca şi contaminanți chimici, se află ca noxe în arealul existențial (aer, apă, sol), se utilizează ca şi produse chimioterapice sau sunt introduse în diverse produse cosmetice.

O seamă de reacții de hidroliză, oxido-reducere, complexare etc., care afectează *biotransformarea xenobioticelor* se desfăşoară - ino tempore - cu reacțiile care reprezintă aşa numitele "căi biochimice" (biochemical pathways) specifice pentru *metabolizarea nutrienților*.

Studiul biotransformării xenobioticelor în organism interesează îndeosebi nutriția, şi farmacologia. În nutriție interesează vasta problemă a *contaminanților alimentari*. Între aceştia, din punct de vedere chimic importanță majoră prezintă contaminanții chimici reprezentați de: *aditivi alimentari* - utilizați în procesarea produselor alimentare; *poluanți chimici alimentari* - proveniți din contaminarea accidentală, care reprezintă un pericol major pentru sănătatea omului. În farmacologie şi farmacoterapie sunt importante studiile asupra produselor chimioterapice - obținute prin procedee de extracție şi/sau de sinteză - administrate per oral sau parenteral şi efectele farmacotoxicologice. Efectele contaminării chimice au implicații şi în patologia biochimică.

BUCHAREST MEDICAL UNIVERSITY LIBRARY

Se reiterează faptul că din punctul de vedere al poluării alimentelor, denumită adesea - în igiena alimentară "insalubrizare" - se disting: poluanţi de natură chimică, fizică, biologică.

Investigarea xenobioticelor acoperă (după Gibson, 1998) trei arii tematice şi anume:

1) xenobiochimia generală - care include problemele de metabolizarea (biotransformare urmată de translocare şi stocarea substanţelor chimice ajunse din mediu în microorganisme, în plante, organisme animale, precum şi metodologia explorării acestora;
2) toxicologia moleculară - privitoare la mecanismele toxicogene la nivel molecular;
3) farmacologia clinică - focusată spre domeniul farmacocineticii chimioterapicelor în organismul uman.

Problemele de xenobiotică interesează biologia moleculară sub raportul cercetărilor fundamentale şi aplicative. În acest context se consideră că xenobiotica este domeniul de interes pentru universităţi cu atribuţii în formarea (instruirea) specialiştilor, pentru instituţii de consultanţă guvernamentală şi pentru diverse agenţii în a căror competenţă se află probleme de protecţia mediului şi protecţia consumatorului.

Privită largo sensu, xenobiotica vizează produselele străine de organismul uman. Astfel, în "Dordlands Medical Dictionary" se precizează: "xenobioticele sunt chimicale sau microorganisme, sau chiar paraziţi străini de sistemul biologic".

Problema impactului dintre organisme şi xenobioticele de natură chimică interesează astăzi atât regnul vegetal cât şi regnul animal. Studiul mecanismelor de interacţie ale xenobioticelor implică şi abordarea aspectelor de biologie moleculară. Din punct de vedere biomedical - în cazul omului - se studiază xenobioticele de interes nutriţional, între care se includ aditivii alimentari şi substanţele poluante pentru alimente (fără a ignora agenţii biologici şi agenţii fizici), xenobioticele cu implicaţii în patologia biochimică interesând etiopatogenia diverselor boli (mai intens cercetată fiind problema carcinogenezei chimice) şi xenobioticele de interes farmaceutic utilizate în terapie şi în diagnostic.

În prezent, pe plan mondial, există o seamă de publicaţii periodice care abordează sistematic, între alte teme, şi problema xenobioticelor. Cu referire la aceasta, se citează următoarele reviste: Biomarkers, Food additives and contaminants, Inhalation Toxicology, Journal of Toxicology and Environmental Health, Toxicology Methods ş.a. De asemenea, se menţionează faptul că în prezent există un organism ştiinţific internaţional - International Society for the Study of Xenobiotics, care se ocupă şi de publicarea unei reviste de specialitate "Xenobiotica".

Un important moment în sistematizarea noţiunilor despre xenobiotice l-a reprezentat organizarea seriei de workshop-uri cu titlul generic de "IMTOX" (Impact Metabolism and Toxicology Organic Xenobiotics). În acest cadru, se menţionează că la al 4-lea Workshop IMTOX s-au abordat complexe probleme privind: xenobioticele şi genotoxocitatea în cazul metalelor grele, a aluminiului şi hidrocarburilor aromatice policiclice, la plante (Micieta et al., 1997); problema aducţilor DNA ca biomarkeri pentru genotoxicitate (Keith et al., 1997; Weber-Lotfi et al., 1997); biodegradarea pesticidelor în sol (Tykva şi Morais, 1997); biodegradarea hidrocarburilor clorurate în diverse arii forestiere (Plümacher şi Dombrowsky, 1997); detoxificarea prin conjugare a xenobioticelor (Schröder et al., 1997). Aceste exemple reflectă importanţa şi gravitatea problemelor abordate de xenobiotică.

Studiul detoxificării are în vedere problema biotransformării xenobioticelor la nivel celular - în ficat, eliminarea acestora prin bilă în intestin (Mitchel, 1999). Revenirea la echilibrul homeostatic este dependentă, în general, de capacitatea eliminării toxinelor celulare. Abilitatea detoxifierii, în concepţia autorilor, este corelată cu factori de mediu, cu modul de viaţă, cu obiceiurile alimentare şi cu stresul emoţional sau fizic. Acestea se constituie în principali factori care pot greva efectul de detoxifiere, adesea în relaţie cu expunerea la toxinele din mediul ocupaţional (profesional) şi/sau din mediul existenţial.

În investigarea xenobioticelor se vorbeşte în prezent despre aşa numitele "bioanalize" şi "metode bioanalitice" introduse tot mai frecvent în cadrul departamentelor de studiu al medicamentelor şi al nutrienţilor, precum şi al toxicologiei. Investigarea analitică se bazează pe metode specifice chimiei fizice, cum ar fi: spectrofotometria, cromatografia, spectroscopia de masă, metode magnetochimice, dicroismul circular ş.a. O precizare specială se face cu privire la faptul că departamentele de bioanaliză au inclus şi utilizarea unor metode specifice biologiei moleculare (Gârban, 1999). În acest context se citează utilizarea metodei amprentei DNA (DNA fingerprinting), a metodelor de hibridizare a RNA ş.a. Astfel de metode au fost folosite, spre exemplu, pentru studiul bacteriilor în organismul cărora s-a produs biotransformarea unor xenobiotice cu structură aromatică, fenolică, compuşi din clasa hidrocarburilor policiclice aromatice (Vand şi Soltmann, 1999).

Xenobioticele luate în studiu sunt, în principal, chimicale care acced în sistemele vii din mediul exterior, e.g.: medicamentele de uz terapeutic sau diagnostic, constituenţii non-nutritivi ai alimentelor şi diverşii poluanţi chimici cum ar fi produşii naturali, solvenţii, pesticidele, micotoxinele, metalele grele etc.

12.2. XENOBIOTICE DE INTERES NUTRIŢIONAL

În acest volum se prezintă date generale, evidenţiindu-se preocupările existente în acest domeniu, orientate spre protecţia consumatorului şi, în general, spre protecţia mediului. În acest cadru se va discuta predilect problema *xenobioticelor care acced* în organism odată cu principiile nutritive (nutrienţi), pe *cale digestivă.*

Principiile nutritive existente în alimentele ingerate, sunt supuse proceselor de digestie şi absorbţie, urmate de distribuţie, metabolizare şi eliminare. Evident trebuie avut în vedere faptul că alături de principiile nutritive se pot afla substanţe contaminante considerate, în general, ca şi xenobiotice.

Contaminanţii chimici alimentari sunt substanţe care ajung în produsele alimentare din mediul ambiant: a) ca o consecinţă a aplicării tehnologiilor agricole, specifice pentru combaterea bolilor şi dăunătorilor; b) ca urmare a instituirii acţiunilor zoo-veterinare igienizare, profilaxie, terapeutică; c) datorită metodelor de procesare a alimentelor, de conservare şi stocare a acestora etc.

În accepţia cunoştinţelor actuale privind contaminarea chimică a alimentelor se consideră că există: 1) contaminare deliberată - prin aditivarea alimentelor cu coloranţi, conservanţi, antioxidanţi, edulcoranţi etc.; 2) contaminare ilicită- prin poluarea chimică a alimentelor cu diverse substanţe organice şi/sau anorganice.

Cunoaşterea preceptelor xenobioticii relevă faptul că există compuşi chimici care se pretează utilizării ca "aditivi" (în cadrul unor prevederi legislative pentru procesarea alimentelor (contaminarea deliberată) şi compuşi chimici caracterizaţi prin bioincompatibilitate şi recunoscuţi ca "poluanţi chimici", (contaminarea ilicită). Acest mod de abordare are în vedere şi mecanisme de acţiune care fac obiectul de studiu al xenobiochimie. Problemele de xenobiotică interesează aditivii alimentari, aditivii de interes farmaceutic şi chiar la substanţele farmacologic active utilizate în chimioterapie. De asemenea, interesează efectele toxicologice acute, subacute sau cronice cu implicaţii biomedicale în cazul poluanţilor chimici.

În baza conceptelor tehnologiilor privitoare la procesarea alimentelor - făcând abstracţie de principiile cu care operează xenobiotica - se utilizează noţiunile de "aditivi alimentari" şi "contaminanţi alimentari" (denumirea de "contaminanţi alimentari" se identifică, în acest caz, cu aceea de "poluanţi"). Această utilizare a terminologiei se regăseşte şi în lucrările elaborate de diversele Comitete mixte FAO/OMS de experţi în domeniul aditivilor alimentari (e.g.: v. Raport 33/1989; Raport 37/1991 ş.a.)

Discutarea problemei xenobioticelor - în accepţia contaminării deliberate şi/sau ilicite - implică cunoaşterea compoziţiei chimice şi a relaţiei structură-activitate la substanţele care se pot constitui în contaminanţi ai alimentelor. În acest context, se abordează xenobioticele de natură chimică şi de interes alimentar - între care se includ: aditivii alimentari şi poluanţii chimici alimentari.

12.2.1. ADITIVI ALIMENTARI

Problema aditivilor prezintă un interes major pentru procesarea produselor alimentare. În Comunitatea Economică Europeană, abreviată în lucrările de specialitate prin CEE (fr.Communaute Economique Europeenne) sau EEC (engl.European Economic Community), există Directiva - Cadru nr. 89/107/EEC referitoare la aditivi. În aceasta se

prezintă: definiţia aditivilor alimentari, regulile de comercializare, condiţii de puritate, criteriile generale de utilizare etc.

În S.U.A. problemele referitoare la testarea, avizarea, comercializarea şi utilizarea aditivilor în procesarea alimentelor se află sub incidenţa unui for guvernamental - Administraţia pentru Alimente şi Medicamente - FDA (Food and Drug Administration).

Pe plan mondial problema aditivilor a fost, şi este, obiect de studiu şi decizie al diverselor Comitete mixte de experţi FAO şi OMS care, au elaborat metodologii de investigare şi norme de aplicare.

Conform Directivei - Cadru 89/107/EEC pentru aditivii alimentari s-a dat următoarea definiţie: "orice substanţă care nu se consumă ca produs alimentar ca atare şi care nu este folosit ca ingredient, indiferent dacă are sau nu valoare nutritivă, dar care devine direct sau indirect un component al produselor alimentare şi/sau al produselor auxiliare, adăugarea lor având scopuri tehnologice, de fabricaţie, procesare, tratare, ambalare, transport sau stocare".

Utilizarea aditivilor în procesarea alimentelor este precedată - pentru fiecare compus chimic avizat ca aditiv - de ample studii asupra compoziţiei, structurii chimice, relaţiei structură chimică-activitate biologică, posibilelor efecte toxice etc. Se întreprind cercetări experimentale in vitro şi in vivo, acestea din urmă prin experimente asupra animalelor de laborator (e.g. cobai, şobolani, şoareci, iepuri etc.). Din astfel de cercetări se pot obţine date privind mecanismele de biotransformare, efectele asupra homeostaziei biochimice, riscul inducerii de injurii biochimice, se stabilesc relaţiile doză-efect ş.a.m.d.(Elias et al., 1972; Souverain, 1979; Gârban et al., 1984; Knudsen, 1989; Salas et al., 1990; Gârban et al., 1993; Mol şi Mol, 1998)

De asemenea, se întreprind studii cu privire la nutriţia omului care constau în observaţii şi chiar examene de laborator vizând consumatorii. Se exemplifică în acest sens studiile asupra efectelor induse de consumul unor "suplimente alimentare" cu conţinut de micronutrienţi (e.g. vitamine, săruri minerale). Diverşi compuşi minerali sunt utilizaţi adesea ca aditivi alimentari (e.g.: citraţi, ascorbaţi etc.) care se pretează, de asemenea, investigaţiilor specifice laboratorului de chimie clinică (v. şi Mincu, 1985).

Un studiu de sinteză, bazat pe compilarea datelor din literatura de specialitate şi a diverselor rapoarte elaborate de comitete mixte de experţi FAO/OMS, a fost efectuat în cadrul disciplinei de Biochimie şi Biologie moleculară cu referire la specificul etapelor (stadiilor) de evaluare a aditivilor alimentari (Gârban, 1994). Date din această lucrare sunt prezentate în tabelul 12-1.

Tabel 12-1. Stadii în evaluarea generală a acţiunii aditivilor (Gârban et al., 1994)

Domeniul abordat	Investigaţii specifice
1.Caracteristicile grupei de compuşi chimici (privitor la aditivi)	Documentarea în literatura de specialitate (chimie-biochimie)
2. Stadiul actual al cunoştinţelor în studiile de toxicologie (metabolism, efecte)	Documentarea în literatura de specialitate (fiziologie, chimie clinică, toxicologie)
3. Examen toxicologic 3.1. Efecte acute 3.2. Efecte subacute 3.3. Efecte cronice	Experimentare pe animale de laborator (1) Teste generale (2) Teste generale (3) Teste speciale (teratogenitate, mutagenitate, carcinogenitate)
4. Alte studii 4.1. Biochimie şi chimie clinică 4.2. Clinico-biologice 4.3. Biomedicale	Experimente pe animale (1) Mecanisme de acţiune, homeostazie, homeorezie etc. (2) Date clinice, diagnostic (3) Terapie experimentală
5. Măsuri preventive	Observaţii şi examene efectuate asupra consumatorilor
6. Studii populaţionale	Bazate pe date epidemiologice

Este relevantă etapizarea cercetărilor şi acurateţea cu care se procedează la investigarea fiecărei substanţe care urmează a fi utilizată ca aditiv pentru alimente. Astfel de probleme au fost abordate în lucrările de la Primul Simpozion Internaţional cu tema "Metalele în Mediu, Medicină şi Biologie" - MEEMB (Metal Elements in Environment, Medicine and Biology) desfăşurat la Timişoara în 1993.

În grupa aditivilor alimentari se includ diverse substanţe chimice a căror clasificare se face în funcţie de criterii specifice alimentaţiei, nutriţiei şi tehnologiei sau biotehnologiei alimentare aplicate (Souverain, 1979, 1986; Luck, 1980; Banu et al., 1985; Macrae et al., 1992; Moll şi Moll, 1998; Banu et al., 2000). O clasificare a aditivilor, chiar sumară, implică prezentarea principalelor clase de compuşi.

Coloranţi. Sunt substanţe chimice naturale obţinute prin extracţie sau rezultate din sinteze chimice. Se folosesc, în general, pentru a restabili culoarea unui aliment după procesare sau pentru a conferi culoare unui produs lipsit de culoare.

Dintre coloranții naturali se menționează: *carotenoidele* (galben-portocaliu sau roșu) E 160; *clorofilele* (verzi) E 140; *antocianele* (culori diverse: roșu, violet, albastru) E 163; *riboflavina* (galbenă) E 101 etc. Cu titlu informativ se menționează că antocianele sunt formate dintr-un rest glucidic și un aglicon reprezentat printr-o antocianidină, e.g.: pelargonidina, delfinidina, cianidina, peonidina ș.a..

În cadrul coloranților de sinteză numiți și "coloranți artificiali" se includ: coloranții *azoici*, e.g.: tartrazina (galbenă) E 102, azorubina (roșie) E 122; coloranții *triarilmetanici*, e.g.: verde acid brillant BS (verde) E 142; coloranți *xantinici*, e.g.: eritrosina (roșie) E 127 etc.

Prima reglementare în CEE referitoare la coloranți apare în Directiva Consiliului CEE din 26 noiembrie 1962 cu amendamente în 1965, 1967, 1969, 1971, 1976, 1978 etc. și ulterior s-a emis Directiva 94 / 36 EC din 30 iunie 1994. Se prezintă aceste detalii, doar pentru coloranți, spre a observa rigoarea cu care se urmărește problema utilizării aditivilor în procesarea produselor alimentare.

Conservanți. Sunt compuși chimici utilizați pentru pregătirea produselor alimentare și protejarea acestora față de acțiunea microorganismelor spre a se asigura o prelungire a duratei de păstrare.

Utilizarea substanțelor antiseptice ca și conservanți alimentari - prin inhibarea dezvoltării bacteriilor (e.g.: Clostridium, Salmonele ș.a) și a miceților (mucegaiurilor) poate asigura inocuitatea alimentelor.

În mod curent pentru aditivare se folosesc conservanți care sunt: compuși organici, e.g.: acidul acetic E 260, acidul lactic E 270, acidul propionic E 280; compuși anorganici, e.g.: azotit de potasiu E 249, azotat de potasiu E 252, anhidrida carbonică E 290.

Antioxidanți. Sunt compuși chimici utilizați pentru protejarea produselor alimentare față de procesele de oxidare sau autooxidare (i.e. râncezirea) și adesea pentru menținerea culorii modificată și aceasta prin oxidare. Deci antioxidanții au rol în prelungirea duratei de păstrare.

În grupa aditivilor cu acțiune antioxidantă se includ, de fapt, compuși cu proprietăți diferite (Souverain, 1986) dintre aceștia se exemplifică: a) *agenți antioxidanți*, e.g.: acidul ascorbic E 300 și ascorbații de Na, de Ca; extracte naturale bogate în tocoferol E 306 și α-tocoferolul de sinteză E 307; galatul de octil E 311 și galatul de dodecil E 312; b) *substanțe cu acțiune oxidantă, dar și cu alte funcții*, e.g.: anhidrida sulfuroasă E 220; sulfatul acid de sodiu E 222, lecitina E 322 ș.a.; c) *substanțe care potențează acțiunea agenților antioxidanți*, e.g.: acidul citric E 330; acidul tartric E 334; acidul ortofosforic E 338 și sărurile de Na, K sau Ca ale acestuia.

Interacția dintre aliment și antioxidanții aditivați se produce în diverse moduri. Se menționează în acest sens capacitatea unor antioxidanți de a reține oxigenul blocând astfel oxidarea. În alte cazuri, antioxidanții întrerup lanțul de oxidare prin interacția cu radicalul peroxidic pe care-l dezactivează.

Edulcoranți. Sunt substanțe utilizate pentru a conferi gust dulce produselor alimentare în care sunt încorporate.

În cazul aditivilor alimentari din clasa edulcoranților există unele particularități legate de compoziția și utilizarea în procesare. În acest context se menționează faptul că pentru îndulcirea alimentelor se pot utiliza edulcoranți naturali care, de fapt, sunt și prin-

cipii nutritive, e.g.: zahărul (zaharoza sau sucroza), dextroza - provenită din hidroliza parţială a amidonului, oligozaharide etc.

Edulcoranţii cu specific non-nutritiv, care - in facto - aparţin aditivilor alimentari (v. definiţia) sunt substanţe de extracţie şi/sau de sinteză care aparţin diverselor clase de compuşi. Clasificarea acestora se face, fie în funcţie de aşa numita "putere de îndulcire", fie în funcţie de structura chimică.

Pornind de la structura chimică, se exemplifică câteva grupe de edulcoranţi: a) *cu structură proteică,* e.g.: curculina cu masa moleculară 12.400 Da, extrasă din planta Curculigo latifolia; miraculina cu masa moleculară 24.000 Da, extrasă din arbustul tropical Richardella dulcifica etc.; b) *polialcooli*, e.g.: manitolul, sorbitolul, xilitolul etc.; c) *produşi de sinteză*, e.g.: zaharina - o sulfimidă benzoică sintetizată în 1879; dulcina - derivatul 4-etoxilat al fenilureei - sintetizat în 1884; acidul ciclamic, i.e. acidul ciclohexil-sulfamic sintetizat în 1937 şi ciclamaţii - sărurile de Na sau de Ca (ciclohexil-sulfamatul de Na sau de Ca); aspartamul - esterul metilic al aspartilfenilalaninei - sintetizat în 1965 vizând iniţial doar utilizarea farmaceutică; d) *glicozide diverse*, e.g.: osladina - glicozid sterolic extras din rădăcinile plantei Polipodium vulgare; steviozidul - glicozid diterpenic extras din frunzele plantei Stevia rebaudiana; e) *alţi compuşi*, e.g.: glicirizina - o saponină extrasă din rădăcina plantei Glycyrrhiza glabra (lemn dulce); filodulcina - o izocumarină extrasă din frunzele plantei Hydrangea thunbergii.

Preparate enzimatice. Sunt produse obţinute din diverse suşe bacteriene selectate. Aceste produse se pretează folosirii pentru procesarea alimentelor în anumite tehnologii fermentative. Mai frecvent utilizate sunt: α–amilaza; chimosina A, chimosina B. Unele preparate enzimatice se pot obţine prin metode specifice biologiei moleculare (v. Cap. 9.2.4.2.)

Emulsifianţi. Substanţe care intervin în formarea şi menţinerea emulsiilor: emulsii de tipul apă-ulei respectiv ulei-apă (această clasificare are în vedere cuantumul celor doi compuşi participanţi).

Sechestranţi. Sunt substanţe chimice care intervin în formarea unor complexe cu ionii metalici. Deşi, aparent de importanţă mai redusă, sechestranţii sunt implicaţi în procesele biochimice ale metabolismului hidro-electrolitic.

Stabilizanţi. Substanţe care fac posibilă menţinerea, deci stabilizarea unei anumite stări fizico-chimice pe care o are produsul alimentar, spre exemplu, se pot menţine în stare de dispersie anumite lichide nemiscibile. Stabilizanţii intervin, de asemenea, în menţinerea sau intensificarea culorii unui anumit produs alimentar.

Acidulanți. Sunt substanțe care măresc aciditatea și conferă gust specific produselor alimentare.

Alți aditivi. În afara aditivilor menționați se cunosc alte numeroase substanțe care în clasificarea acestor aditivi sunt considerați aditivi de tipul: *agenți antispumanți*, *regulatori de pH*, *suporturi aditive* care ajută la dizolvarea sau/și dispersia aditivului, *potențiatori de aromă*, *agenți de spumare* care asigură formarea unei dispersii omogene în sisteme gaz-lichid sau gaz-solid, *agenți de gelificare*, *agenți de glazurare*, *gaze de ambalare* etc.

12.2.2. POLUANȚI CHIMICI ALIMENTARI

O grupă aparte de xenobiotice de interes nutrițional sunt poluanții chimici alimentari care pot însoți nutrienții prezenți în alimente. În acest cadru se discută contaminarea accidentală produsă de substanțe foarte diferite sub raportul compoziției chimice și relației structură chimică-activitate biologică. O vastă literatură de specialitate tratează problema contaminanților chimici, a structurii compușilor, relației structură-activitate, a mecanismelor patogenezei cu utilizarea conceptelor patobiochimiei și fiziopatologiei, a efectelor toxice la nivel de celulă, țesut, organ a acțiunii embriotoxice (rezorbția embrionară, moartea fetală) și a implicațiilor în procesele teratogene, mutagene și oncogene (Kaspari, 1938; Pullman și Pullman, 1955; Lee, 1972; Edwards, 1973; Roig, 1973; Moreau, 1974; Beuchart, 1978; Zamfir, 1979; Luck, 1980; Popa și Stănescu, 1981; Haiduc și Zuckermann, 1985; Popa, Segal et al., 1986; Knudsen, 1989; Gârban et al., 1998b; Ehling și Gârban, 1999). O inserare a principalelor grupe de poluanți chimici alimentari se face în continuare.

Pesticidele. Aceste substanțe sunt utilizate frecvent în agricultură pentru protecția plantelor față de boli și dăunători, cu scopul asigurării unor recolte mari și stabile. Aflate ca și substanțe reziduale în alimente, pesticidele sunt considerate poluanți chimici (Leitner, 1969, 1974; Zamfir, 1979; Popa et al., 1986)Clasificarea pesticidelor are în vedere agentul fitopatogen și, în general, agentul patogen.În grupa pesticidelor se includ: *fungicide* - utilizate în combaterea ciupercilor parazite, *insecticide* - utilizate pentru combaterea insectelor dăunătoare, *acaricide* - utilizate în combaterea acarienilor paraziți, *ierbicide* - utilizate în combaterea buruienilor, *nematocide* - utilizate în combaterea viermilor paraziți, *moluscocide* - utilizate pentru combaterea gasteropodelor dăunătoare și *raticide* - utilizate pentru combaterea rozătoarelor.

Din punct de vedere chimic pesticidele se includ în diferite clase de substanțe: *compuși organoclorurați*, e.g.: Hexaclor-ciclohexan (HCH), Clordan, DDT (diclor-

difenil-tricloretan sau cu numele chimic, 1,1,1-triclor-2,2-bis-/ clorfenil /-etan), Lindan, Dieldrin, Aldrin etc.; *compuşi organofosforaţi,* e.g.: Mercaptofos, Metafos, Fosfamid, Carbofos, Clorofos etc.; *compuşi carbamaţi* şi *ditiocarbamaţi*, e.g.: Maneb, Ziram, Zineb etc.;

Micotoxinele. Constituie o altă grupă de substanţe cu rol poluant. Micotoxinele sunt metaboliţi a căror biogeneză este realizeată de către miceţii (mucegaiurile) care se dezvoltă pe un anumit substrat (Moreau, 1974; Gârban et al., 1985; Popa et al.,1986). Adesea acest substrat este reprezentat de alimente. Micotoxinele se află în sporii miceţilor, în talul acestora ca produşi de secreţie, sau pe substratul pe care se dezvoltă miceţii. Dintre micotoxine mai cunoscute sunt: aflatoxinele - AF (de tip B_1, B_2, G_1, G_2, M_1, M_2 ş.a.), ochratoxina, patulina, zearalenonele etc.

Hidrocarburile policiclice aromatice. Se produc prin combustia materialelor organice sau pot apare ca şi contaminanţi ai mediului în anumite zone industriale. Remarcabil este faptul că hidrocarburile policiclice aromatice (HPA) pot să se formeze şi în cadrul unor sinteze naturale endogene ca o consecinţă a acţiunii microorganismelor. Se menţionează că microorganismele diferite, cum ar fi E. coli, Clostridium, algele ş.a., pot realiza biosinteza HPA. Mici cantităţi de HPA au fost decelate şi în produse alimentare: cartofi, morcovi, sparanghel, castraveţi, ciuperci, mere, gulii, arahide etc. Dintre HPA mai cunoscute sunt: benz(a)antracenul, benz(a)pirenul, crisenul, coronenul etc.

Structura aromatică este implicată în procesele de biotransformare. Din acest considerent se acordă o importanţă deosebită studiilor fizico-chimice asupra structurii la diverse xenobiotice, e.g. poluanţi chimici, produse chimioterapice etc. (Pullman şi Pullman, 1955; Nemţescu, 1980; Mănescu et al., 1994; Pârvu, 1997; Gârban et al., 1998b).

Antibioticele. Se află îndeosebi în produse alimentare de origine animală, ca o consecinţă a introducerii acestora în furaje cu scopul de-a ameliora randamentul de creştere a animalelor. De asemenea, pot proveni din utilizarea profilactică şi/sau terapeutică la animalele de fermă. Antibioticele sunt utilizate uneori şi pentru creşterea conservabilităţii produselor alimentare pentru uz uman, procedeu interzis din punct de vedere medical. O opinie existentă astăzi în domeniul igienei şi a patologiei este aceea referitoare la sugestia de a nu se folosi acelaşi tip de antibiotice în terapia animalelor şi omului.

Două sunt problemele majore ale hazardului în utilizarea antibioticelor: antibiorezistenţa indusă şi toxicitatea prin remanenţă.

Nitraţii şi nitriţii. Reprezintă o categorie de contaminanţi de natură anorganică, care se pot afla în produse alimentare de origine animală şi vegetală provenind din mineralizarea substanţelor organice, sau se pot afla ca "materii prime" pentru sinteza proteinelor absorbite de rădăcinile plantelor din sol (Liener, 1969; Popa et al., 1986;

Mănescu et al., 1994). Nitraţii şi nitriţii provin din îngrăşămintele administrate sau din produşi de degradare a materiei organice în sol. Azotul din sol este absorbit de către plante în principal sub formă de nitraţi sau de săruri de amoniu.

În plante nitraţii suferă două reduceri consecutive sub acţiunea succesivă a două metalflavonoenzime: nitratreductaza (care conţine Mo) - reduce nitritul la nitrat; nitritreductaza (care conţine Fe şi Cu) - reduce nitritul la oxid de azot. Reacţia generală se poate prezenta astfel:

$$\underset{\text{nitrat}}{NO_3^-} \xrightarrow{\text{nitratreductaza (Mo)}} \underset{\text{nitrit}}{NO_2^-} \xrightarrow{\text{nitritreductaza (Fe, Cu)}} \underset{\text{oxid de azot}}{NO}$$

În organism, mai departe, oxidul de azot este transformat sub acţiunea enzimelor în hidroxilamină, în amide şi în final în aminoacizi care vor intra în compoziţia proteinelor. Transformările prezentate mai înainte se pot referi la ţesuturile vegetale şi implicit la produsele alimentare de origine vegetală.

S-a constatat, de asemena, că există nitraţi şi nitriţi în produsele de origine animală, se menţionează în acest sens existenţa de nitraţi în lapte şi produse lactate. În anumite ţări din zonele calde, pentru conservarea laptelui destinat preparării brânzeturilor s-a acceptat adăugarea de nitraţi sau nitriţi. În carne şi ouă cuantumul nitraţilor este extrem de redus, la fel al nitriţilor, fapt explicat de trecerea rapidă prin organism a acestor compuşi absorbiţi la nivel de intestin şi excretaţi la nivel de rinichi.

În organismul omului, nitraţii şi nitriţii pot să provină din consumul de alimente care au aceşti produşi sau prin exacerbarea activităţii florei intestinale care contribuie la descompunerea alimentelor şi eliberarea unor compuşi care au la origine nitraţii şi nitriţii şi care pot să evolueze spre nitrozoderivaţi care au acţiune toxică prin efectele induse asupra hemoglobinei, caracterizată prin formarea methemoglobinei. De asemenea, nitraţii şi nitriţii intervin în inhibarea activităţii mitocondriale prin limitarea fosforilării oxidative. S-au evidenţiat şi efecte mutagene ale nitraţilor, acestea au fost explicate prin formarea nitrozaminelor. Acţiunea toxică a nitrozaminelor este importantă pentru cunoaştere, deoarece efectele mai îndepărtate ale acesteia conduc atât la procese mutagene cât şi la procese carcinogene.

Metale cu potenţial toxicogen. În biochimie şi nutriţie se discută problema metalelor de interes fiziologic prezente în condiţii normale în organism (aşa numitele biometale), cât şi a metalelor prezente accidental, cunoscute sub denumirea generică de metale cu potenţial toxicogen (Little şi Martin, 1974; Underwood, 1977; Ghergariu, 1980; Prasad, 1988; Rubin şi Farber, 1990) . În grupa acestora din urmă intră Pb, Hg, Cd, Al,

Sn, Ag, Au, Ni şi altele. Metale cu potenţial toxicogen ajung în alimente prin multiple căi: cu materiile prime în care se depozitează în urma tratamentelor aplicate plantelor de cultură; în cursul procesării alimentelor; în timpul transportului şi depozitării.. Metalele pot ajunge în alimente şi datorită proceselor de coroziune care afectează instalaţiile de procesare uneori şi ambalajele.

Metale au fost decelate în: fructe, legume fiind absorbite din sol, preluate din atmosfera poluată sau, uneori, din instalaţiile tehnologice. De asemenea, au fost descoperite în produsele alimentare de origine animală, deobicei în viscere (ficat, rinichi), unde se acumulează ca o consecinţă a proceselor metabolice, precum şi în peşte şi conserve de peşte.

Datele expuse mai sus pot oferi o privire generală asupra poluanţilor chimici din clasa compuşilor organici, e.g.: pesticide, hidrocarburi policiclice aromatice, micotoxine etc., precum şi din clasa compuşilor anorganici, e.g.: nitraţi, nitriţi, metale cu potenţial toxicogen.

12.3. XENOBIOTICE DE INTERES FARMACEUTIC

12.3.1. MEDICAMENTE CHIMIOTERAPICE

Conceptul de medicamente chimioterapice a fost acreditat pentru a defini substanţele medicamentoase obţinute prin sinteză, prin extracţie sau prin activitatea unor microorganisme (Salmon şi Apple, 1976; Cionga şi Avram, 1978; Neidle şi Waring, 1993). Substanţele astfel obţinute sunt supuse purificării şi condiţionării în vederea administrării la om.

Iniţial noţiunea de "chimioterapie" a fost utilizată în 1909 de Ehrlich care făcea referire la administrarea unei anumite substanţe chimice pentru a trata şi vindeca o infecţie produsă la un animal de experienţă. Noţiunea şi-a dobândit recunoaştere odată cu progresul cunoştinţelor de fiziologie şi fiziopatologie, de biochimie şi patobiochimie precum şi de farmacologie (Burger, 1970 - citat de Cionga şi Avram, 1978).

În chimioterapie şi-au aflat aplicare şi progresele realizate în toxicologie, stabilindu-se valoarea aşa numitului indice terapeutic (IT) caracterizat prin raportul dintre doza semiletală (DL_{50}) şi doza eficace (DE_{50}). Valoarea IT se poate exprima prin relaţia:

$$IT = DL_{50} / DE_{50}$$

cunoscându-se faptul că odată cu creşeterea valorii IT medicamentul are o limită de siguranţă mai mare.

Clasificarea medicamentelor chimioterapice se face în funcţie de diverse criterii, e.g.: clasa de compuşi chimic; sursa de provenienţă; calea de obţinere (sinteză, extracţie); domeniile de utilizare în farmacologia clinică etc. (Goodman şi Gilman, 1960; Burger, 1970; Salmon şi Apple, 1976; Cionga şi Avram, 1978; Neidle şi Waring, 1993 ş.a.)

În acest volum se va prezenta - cu scopul de-a avea o imagine sinoptică - grupele de medicamente chimioterapice după Cionga şi Avram (1978), mai obişnuite pentru literatura de specialitate din limba română. Conform acestei clasificări se disting:

1. Sulfamide cu acţiunea bacteriostatică
2. Antibiotice
3. Medicamente folosite în tratamentul tuberculozei şi leprei
4. Medicamente folosite în combaterea bolilor provocate de protozoare (i.e. antimalarice, antihelmintice,antitrichomonazice, antitripanosomiazice etc.)
5. Medicamente antiluetice
6. Medicamente antimicotice
7. Medicamente antihelmintice
8. Medicamente cu acţiune antivirală
9. Medicamente cu acţiune citostatică

Cu referire la medicamentele chimioterapice, este important de subliniat că din punctul de vedere al xenobiologiei acestea sunt considerate *xenobiotice* .

Se reiterează faptul că problema chimioterapicelor interesează un domeniu special al xenobioticii, i.e. farmacologia clinică - orientată spre studiul farmacocineticii chimioterapicelor în organismul uman (Gibson, 1998).

Astfel, în cadrul xenobioticelor, alături de contaminanţii chimici ai alimentelor (aditivi - contaminare deliberată şi poluanţi - contaminare ilicită) se includ şi medicamentele chimioterapice.

12.3.2. CHIMIOTERAPICE CITOSTATICE

Chimioterapia - ca şi metodă terapeutică în domeniul oncologiei - a fost precedată de investigaţii efectuate pe animale de experienţă. Se recunoaşte faptul că tumorile provocate la animale de experienţă (produse cu substanţele cancerigene, e.g.: hidrocarburi policiclice aromatice - HPA) nu sunt complet identice cu tumorile maligne la om (Graffi şi Bielka, 1959). Cu toate acestea studiile asupra chimioterapiei bazate pe citostatice au fost continuate, aducând importante informaţii pentru orientarea conduitei terapeutice în oncologie.

Între medicamentele cu acţiune citostatică (i.e. chimioterapicele citostatice) se includ compuşi care aparţin diverselor clase de substanţe:

1. Medicamente alchilante, e.g.: a) derivaţi ai cloretilaminei (numiţi cu un termen generic şi azotiperitici); b) epoxizi; c) derivaţi ai etilenaminei etc.
2. Antimetaboliţi, e.g.: a) antagonişti cu nucleu purinic; b) antagonişti cu nucleul pirimidinic; c) antagonişti cu nucleu pteridinic
3. Compuşi citostatici obţinuţi prin extracţie sau prin sinteză, e.g.: a) citostatice provenite din plante; b) antibiotice cu acţiune citostatică; c) hormoni steroizi (androgeni, estrogeni, progestativi etc.); d) compuşi diverşi între care se includ: derivaţi ai glioxalului, derivaţi de uree, derivaţi de ftalanilide, enzime (e.g.: L-asparaginaza), compuşi coordinativi (e.g: cis-platina), derivaţi de piperizină.

Problema chimioterapicelor citostatice a fost intens studiată datorită extinderii aplicaţiilor clinice în cadrul complex al polichimioterapiei în oncologie (Waring, 1981; Pană et al., 1983; Gârban et al., 1990; Neidle şi Waring, 1993; Lippert, 1999 ş.a.).

12.4. XENOBIOTICE DE INTERES NUTRIŢIONAL ÎN CARCINOGENEZA CHIMICĂ

12.4.1. PRIVIRE SINOPTICĂ

Problema mutagenezei, carcinogenezei şi teratogenezei chimice constituie o direcţie de interes major pentru cercetările din domeniul biologiei moleculare, a biochimiei nucleoproteidelor (cu referire îndeosebi la DNA) şi patologiei biochimice, urmărind explicitarea mecanismelor moleculare care definesc apariţia unor compuşi bioincompatibili şi care conduc la injuria biochimică (Bergmann, 1968; Chiricuţă, 1969; Wilson şi Fraser, 1977; Nagata et al., 1980; Baak, 1991). În datele prezentate în continuare s-au urmărit doar aspecte legate de carcinogeneză şi de transformarea malignă (Becker, 1975; Grover, 1979; Lemoine şi Wright, 1993; Seamus, 1997).

Alături de domeniul acestor cercetări, se remarcă studiile asupra mijloacelor chimioterapiei în cancer, i.e. chimioterapia citostatică (Salmon şi Apple, 1976; Avram şi Cionga, 1978; Waring, 1981; Haiduc şi Zuckermann, 1985; O'Dwyer et al., 1997; Teicher, 1997; Lippert, 1999).

Prezentarea succintă a unor aspecte legate de procesul de carcinogeneză (oncogeneză) se limitează doar la problemele conexe biochimiei normale şi patologice (patobiochimiei).

În accepţia cunoştinţelor actuale, mutageneza, carcinogeneza şi teratogeneza ca procese patobiochimice, au o etiologie complexă, pot fi induse de agenţi chimici, e.g.: hidrocarburi policiclice aromatice, compuşi alchilaţi, toxine micotice ş.a. (Becker, 1975; Grover, 1979; Cohn, 1979; Chiricuţă,

1980); agenţi fizici, e.g.: radiaţii ionizante, radiaţii ultraviolete (Becker, 1973; Ghilezan, 1992); agenţi biologici, e.g. ribo-şi deoxiribovirusuri oncogene (Kaplan şi Delpeche, 1990; Cajal, 1990; Fields şi Knipe, 1990; Cernescu, 1996).

În volumul de faţă, dat fiind specificul de Biologie moleculară, se vor aborda doar câteva aspecte referitoare la acţiunea agenţilor chimici şi de implicaţiile acestora în carcinogeneză.

Mecanismele care interesează transformarea malignă în procesul de carcinogeneză, urmăresc substratul biochimic şi biofizic al interacţiilor care afectează – într-o etapă secundă – integritatea structurală şi funcţională a celulelor, ţesuturilor, organelor (deci a diverselor nivele de organizare). De remarcat că nivelele de organizare prezintă o integrare de la simplu la complex, e.g.: cromosomul reprezintă mediul macromoleculelor de DNA, celula – reprezintă mediul cromosomilor, ţesutul – mediul celulelor, organul – mediul tesuturilor ş.a.m.d. Rezultă că acest grandios edificiu al materiei vii reprezintă nivele de organizare deosebite prin creşterea numărului de elemente şi prin gradul de integrare.

Organismul, luat ca un întreg, prezintă o integrare structurală şi implicit o integrare funcţională. Acest cadru integrativ poate explica evoluţia procesului patogen în patologia biochimică (aşa numita "leziune biochimică" – termen acreditat în patologia biochimică) la malignizare şi de la formele neoplazice primare la metastazare. Investigaţiile morfofuncţionale abordând starile normale şi patologice se pot adresa diverselor nivele de integrare (Graffi şi Bielka, 1959; Brookers şi Lawley, 1964; Delaine şi Mignot, 1969; Sarma et al. 1975; Gârban et al, 1981).

Cu referire la problema carcinogenezei, se menţionează faptul că biologia moleculară a contribuit la perfectarea unor metode specifice pentru a se distinge caracteristicile moleculare ale hiperplaziilor - ca proliferări policlonale (benigne) în comparaţie cu neoplaziile - ca proliferări monoclonale (maligne). Se poate afirma însă că nu există o rigoare absolută, deoarece este imposibilă o distingere a monoclonalităţii faţă de oligoclonalitate (Kaplan şi Delpech, 1990). Pentru astfel de investigaţii se folosesc, în principiu sonde moleculare adecvate care permit diagnosticul clonalităţii celulare.

12.4.2. ACIDUL DEOXIRIBONUCLEIC ÎN CARCINOGENEZA CHIMICĂ

Preocupările cercetărilor în domeniul oncologiei din a doua jumătate a sec. XX au fost orientate spre aprofundarea aspectelor ultrastructurale (i.e. moleculare şi subce-lulare) caracteristice procesului de malignizare. În acest context, numeroase investigaţii au fost întreprinse cu privire la aspectele de biologie şi patologie moleculară în relaţie cu injuria biochimică la nivelul DNA. Un prestigios volum, editat de Cohn încă din anul 1979, a făcut posibilă abordarea acestui subiect.

Problema aşa numitei "carcinogeneze chimice" se raportează predilect la DNA, macromoleculă la nivelul căreia se produce injuria biochimică primară. Aceasta constituie, stricto sensu, momentul determinant în denaturarea relaţiei structură chimică – activitate biologică la DNA. Modificările morfofuncţionale la nivel celular şi tisular urmează etapei primare definite prin interacţia DNA cu molecule mici. Această interacţie reprezintă "primum movens" în formarea unor compuşi bioincompatibili care treptat, vor conduce la un proces de malignizare.

În acest context, se reitereză date cu privire la DNA dicatenar dublu helical (structură secundară) cu catene complementare şi antiparalele (fig. 12-1). Se remarcă existenţa legăturilor de hidrogen la două perechi de nucleobaze superpozabile, şi a legăturilor fosfodiesterice din scheletul macromoleculei de DNA.

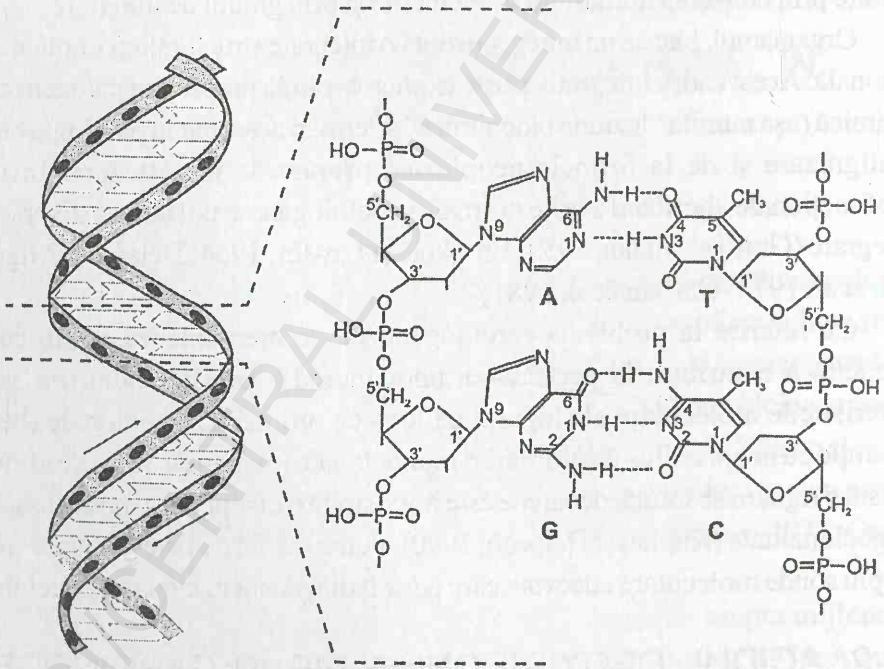


Fig. 12-1. Macromolecula de DNA (structura secundară)
a) reprezentare schematică (globală);
b) legarea catenelor complementare şi antiparalele (detaliu)

Apariţia neoformaţiunilor mutagene şi/sau oncogene este tributară interacţiei DNA cu molecule mici aparţinând diverselor clase de substanţe chimice: compuşi policiclici de tip homonuclear (e.g. hidrocarburi aromatice) şi heteronuclear (e.g. derivaţi

BCU IAŞI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

ai cumarinei, ai aminoazobenzenului); azoderivaţi; compuşi alchilaţi, hormoni steroizi, ioni ai metalelor grele ş.a.

Astfel de compuşi, prezenţi în mediul ambiant – poluând uneori apa, alimentele, aerul – se pot constitui în contaminanţi chimici carcinogeni. Asemenea compuşi chimici provin din industriile cocso-chimică şi petrochimică, din produsele reziduale de la alte industrii (implicit deversările de ape industriale), din gaze de combustie (implicit autovehicule, ţigarete, sisteme de încălzire a încăperilor ş.a.). De asemenea, pot fi produşi de micelii (e.g.micotoxinele) sau rezultaţi din procese cumulative (e.g. unele metale). O vastă literatură referitoare la contaminanţii chimici atestă necesitatea acestora şi implicarea în patologia biochimică (Pullman, 1964; Bergman, 1968; Caillet şi Pullman, 1968; Ionescu, 1973; Zamfir, 1979; Wassom, 1980; Pasternak şi Gibbs, 1996, Gârban, 2000a).

Existenţa unor astfel de substanţe în aliment poate fi tributară, uneori, proceselor tehnologice (deficitare) de prelucrare şi conservare a produselor alimentare. Indiferent de sursa de proveniență, acţiunea patogenă este condiţionată de natura substanţei, cantitatea (pentru astfel de compuşi în anumite cazuri s-au calculat dozele: letală – DL şi semiletală – DL_{50}), durata expunerii şi evident de rezistenţa organismului.

Interacţia dintre DNA şi compuşi cu acţiune carcinogenă conduce, în prima instanţă la formarea unor derivaţi numiţi – în diverse tratate – "asociaţii moleculare", "complecşi ai DNA", "aducţi" etc. Această ultimă denumire şi-a aflat acceptare şi utilizare mai largă.

Interacţia cu unele macromolecule mici poate duce la modificarea parametrilor sterici conformaţionali de tip linear (distanţe) şi angular (unghiurile winding, twisting, tilting), urmată de distorsia şi extensia macromoleculei de DNA dublu helix. Astfel de interacţii pot fi produse de substanţele cu acţiune mutagenă şi/sau oncogenă, de tipul acelora menţionate mai sus.

Destabilizarea structurală a DNA reprezintă prima etapă, care succede injuria biochimică şi are repercusiuni asupra transmiterii mesajului informaţional (conţinut în secvenţa nucleotidelor) în succesiunea proceselor de replicaţie – transcripţie – translaţie. Perturbarea mesajului informaţional se află la originea iniţierii procesului de carcinogeneză.

Pentru a avea o imagine asupra unor compuşi cu acţiune carcinogenă şi a aducţilor formaţi cu DNA se vor prezenta câteva exemple. Aceste exemple se vor rezuma la interacţia DNA cu compuşi policiclici de natură organică şi cu unele metale cu potenţial toxicogen

12.4.3. INTERACŢIA UNOR COMPUŞI ORGANICI POLICICLICI ŞI A UNOR IONI METALICI CU DNA

În continuare se vor menţiona o parte din compuşii organici policiclici cu acţiune carcinogenă şi cu o mai vastă răspândire naturală. De asemenea, se vor face referiri la ionii metalici (proveniţi de la metale cu potenţial toxicogen şi chiar de la biometale aflate în concentraţii excesive).

Compuşii organici policiclici sunt reprezentaţi, în principal, de hidrocarburile policiclice aromatice (HPA) şi aflatoxine (AF). De asemenea se amintesc acetilaminoflorenul şi derivaţii metilaţi ai aminobenzenului.

Problema carcinogenezei chimice, extinsă şi la clase de compuşi, reprezintă un domeniu de interes major care – prin caracterul inter- şi multidisciplinar – a intrat în atenţia specialiştilor din domeniul biochimiei, patologiei biochimice, biologiei moleculare, morfo- şi fiziopatologiei, ecologiei, biologiei şi medicinei experimentale ş.a.

Studiul mecanismelor de carcinogneză la nivel molecular a condus şi la cercetări care au la bază construirea unor modele matematice pentru evaluarea relaţiei structură chimică – activitate biologică la compuşii policiclici. Astfel, Duchene şi Sallantin (1981) au utilizat metoda recunoaşterii formelor pentru cercetarea "puterii cancerigene" a HPA abordând aspectele moleculare ale metabolizării (biotranformării) şi formării complecşilor DNA-metaboliţi. Metabolizarea, mai exact "biotransformarea HPA", conduce la formarea unor derivaţi epoxidixi precursori ai aducţilor (Graffi şi Bielka, 1959; Grover, 1979; Gârban, 1981).

Dintre compuşii anorganici care pot concura la formarea de aducţi, mai cunoscuţi sunt ionii metalici aparţinând metalelor grele şi ionil metalici trivalenţi.

A. Compuşi organici policiclici

a) Hidrocarburi policiclice aromatice

La compuşii policiclici se disting două trăsături caracteristice: planaritatea moleculei şi existenţa electronilor π delocalizaţi. Planaritatea moleculei este importantă pentru activitatea biologică. Devierea de la forma plană poate conduce la modificarea relaţiei structură chimică-activitate biologică. Electronii π delocalizaţi sunt prezenţi în număr mare în cadrul moleculei exceptând legăturile transanulare care sunt mai sărace în electroni.

Hidrocarburile policiclice aromatice reprezintă cea mai vastă clasă de substanţe din cadrul compuşilor policiclici carcinogeni. În această clasă se includ hidrocarburi aromatice: *triciclice* (antracen, 9-metilantracen, 9-fenilantracen, fenentren), *tetraciclice* (tetracen sau naftracen, 1,2-benzantracen, 7,8-benzfenantren, piren, crisen sau 1,2-benzfenantren, *pentaciclice* (pentacen, 1,2,3,4-dibenzantracen, 1,2,5,6-dibenzantracen, 1,2,7,8-dibenzfenantren, 5,6,7,8-dibenzfenantren, 3,4-benzpiren, 20-metilcolantren, benz(b)fluorantren), *hexaciclice* (1,2,3,4-dibenzpiren, 1,2,6,7-dibenzpiren, 3,4,8,9-dibenzpiren, 1,2,7,8-dibenznaftacen şi coronen) etc. Detalii asupra HPA pot fi urmărite în lucrări special consacrate cercetării acestora (Brookes şi Lawley, 1964; Grunberger şi Weinstein, 1979; Gârban, 1981; Lemoine şi Wright, 1993). În fig. 12.2 se exemplifică diverse specii de HPA din clasele tri-, tetra-, penta- şi hexacenelor.

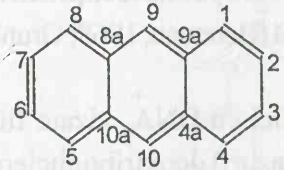
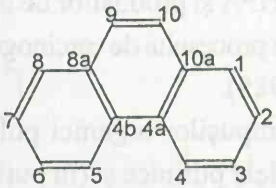
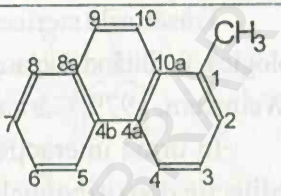
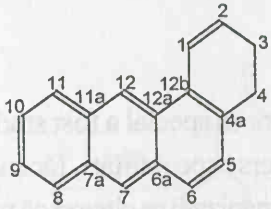
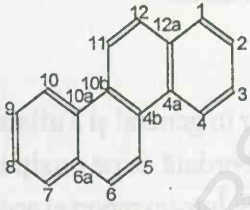
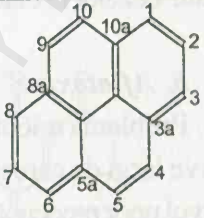
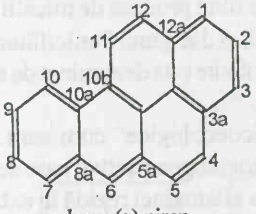
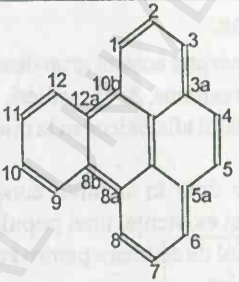
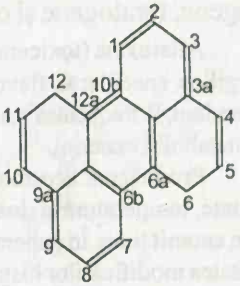
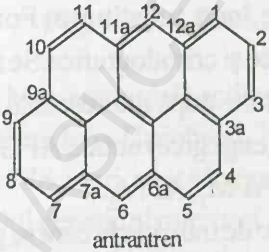
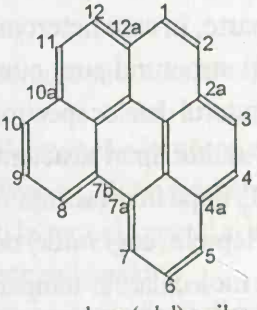
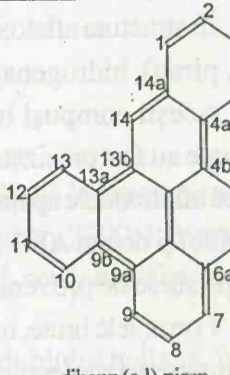
TRICENE	 antracen (I)	 fenantren (II)	 1-metil fenantren (III)
TETRACENE	 benz (a)antracen (IV)	 crisen (V)	 piren (VI)
PENTACEN	 benz (a) piren (VII)	 benz (e) piren (VIII)	 perilen (IX)
HEXACENE	 antrantren (X)	 benz (g,h,l) perilen (XI)	 dibenz (a,l) piren (XII)

Fig.12-2. Hidrocarburi policiclice aromatice - formule structurale

BCU IASI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Trăsăturile sterice ale HPA şi produşilor de degradare pot influenţa activitatea biologică, facilitând declanşarea procesului de carcinogeneză (Bereman, 1968; Grunberger şi Weinstein, 1979; Gârban, 1985).

În urma interacţiei compuşilor organici policiclici cu DNA, vizate fiind cu predilecţie deoxiribonucleotidele purinice şi (în puţine cazuri) deoxiribonucleotidele pirimidinice, apar compuşi cu structură particulară, numiţi aducţi. Legăturile se stabilesc la nivelul bazelor azotate heterociclice.

b. Aflatoxine

Problema micotoxinelor în general şi a aflatoxinelor în special a fost studiată de colective largi de cercetători, abordată de pe poziţia a diverse specialităţi, făcând chiar obiectivul unor preocupări O.M.S. Într-un raport al acestei organizaţii se citează că numărul micotoxinelor depăşeşte azi cifra de 200 tipuri. Unele micotoxine pot induce efecte mutagene, teratogene şi oncogene.

Aflatoxina (toxicumarina) aparţine acestui grup de substanţe fiind produsă de micelii din genul Aspergillus, speciile: A. flavus, A. parasiticus, A. chevalieri, A. wentii şi din genul Penicillium, speciile P.puberulum, P. frequentas ş.a.. Potenţialul aflatoxicogen la miceliile amintite este determinat de elaborarea unor metaboliţi exocrini.

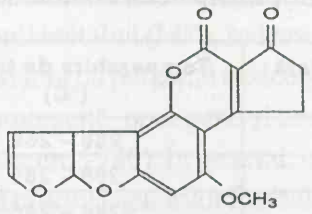
Producerea acestora are loc doar în anumite condiţii "micoecologice" cum sunt: substrat, umiditate, temperatură şi doar în cazul existenţei unei populaţii aflatoxicogene active care se dezvoltă într-un anumit timp. În general, criteriul de estimare pentru activitatea aflatoxinei rezidă în extinderea şi severitatea modificărilor histopatologice.

Aflatoxinele (AF) ca metaboliţi secundari ai fungilor au fost izolate în perioada 1961-1962 în urma unor sindroame toxice apărut la animale domestice sesizate pentru prima oară în Anglia şi Olanda (Wogan, 1966).

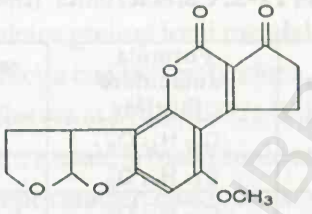
În structura aflatoxinelor (fig. 12-3) se pot remarca heterociclii monoheteroatomici (furan, piran), hidrogenaţi în parte, în care heteroatomul este oxigenul (Gârban et al., 1984). Aceşti compuşi înrudiţi structural sunt cumarine înalt substituite. Formulele structurale au fost precizate cu ajutorul datelor spectroscopice şi cristalografice.Se remarcă faptul că aflatoxinele apaţin mai multor tipuri structurale numite după fluorescenţa albastră (engl.blue) şi notate AFB_1, AFB_2, după fluorescenţa verde (engl.gree) notate AFG_1, AFG_2 sau după sursa de proveniență, laptele (engl.milk) notate AFM_1, AFM_2.

Formulele brute, masele moleculare şi temperaturile de tranziţie la care se produce descompunerea moleculelor de aflatoxine (AFB_1, AFB_2 şi AFG_1, AFG_2) se redau în tabelul 12-2.

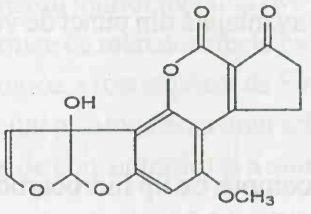
În afara structurilor prezentate au fost izolaţi o seamă de derivaţi oxidrilaţi şi metoxilaţi în diverse poziţii ale policiclilor. Acestea uneori au fost considerate ca noi tipuri de aflatoxine, deşi se poate estima că reprezintă etape ale metabolizării compuşilor iniţiali.



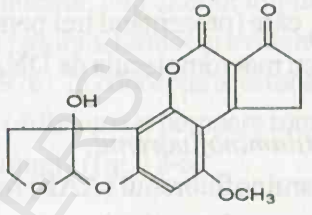
AF B_1



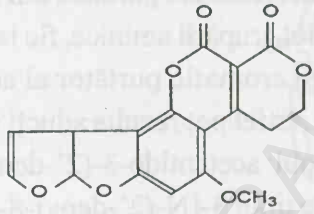
AF B_2



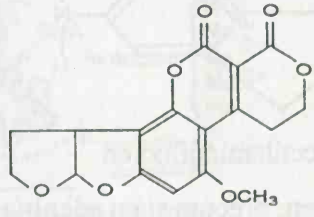
AF M_1



AF M_2



AF G_1



AF G_2

Fig. 12-3. Aflatoxine - formule structurale

Mecanismul de acţiune al aflatoxinelor îşi găseşte explicaţia în interacţia acestora cu acizii nucleici (Jacobson, 1993; Wogan, 1999; Gârban şi Gârban, 2000c). Biopolimeri macromoleculari, ubicvitar prezenţi în regnul vegetal şi animal, acizii nucleici constituie materialul genetic al micro- şi macroorganismelor.

În cursul interacţiei se produce extensia şi distorsia dublului helix şi, în final, desfacerea legăturilor de hidrogen dintre grupele de baze A-T şi G-C. Prin densitatea electronică crescută a unor atomi cum sunt N_7 al guaninei şi al adeninei şi O de la C_4 al timinei aceştia prezintă reactivitate crescută şi accesibilitate pentru interacţia cu un agent chimic extern.

Aflatoxinele cu predilecţie AFB_1 şi AFG_1 care posedă un heterociclu (furanic) marginal nesaturat, prezintă reactivitate crescută. Această reactivitate este mărită la

BCU IASI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Tabel 12-2. Caracteristici fizico-chimice ale principalelor aflatoxine

Aflatoxina	Formula moleculară (brută)	Masa moleculară (Da)	Temperatura de tranziție (°C)
AFB_1	$C_{17}H_{12}O_6$	312	268 – 269
AFB_2	$C_{17}H_{14}O_6$	314	286 – 289
AFG_1	$C_{17}H_{12}O_7$	328	244 – 246
AFG_2	$C_{17}H_{14}O_7$	330	237 - 240

aflatoxina B_1 care (prezentând trei pentaciclii) este avantajată din punct de vedere steric în interacția cu macromolecula de DNA.

c) Acetilaminofluorenul

Acetilaminofluorenul (AAF) reprezintă un compus de tip hidrocarbonat aminat în poziția 2 şi apoi acetilat la gruparea aminică (fig. 12-4). Se formează astfel un compus amidic care poate stabili legături cu nucleobazele purinice din DNA fie la nivelul grupării aminice, fie la nivelul ciclului aromatic purtător al acestei grupări. Astfel pot rezulta aducți cu guanina de tipul: acetamido-3-(2'-deoxi-N_2-guanozil)-fluoren, precum şi cu adenina din DNA de tipul 3-[N-(2'-deoxi-8-guanozil)-acetamido]-fluoren.

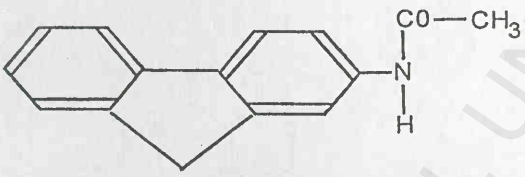


Fig. 12-4. Acetilaminofluoren

d) Aminoazobenzen

Aminoazobenzenul face parte din grupa aminoazoderivaților aromatici cunoscuți sub denumirea generică de "coloranți azoici". Astfel de coloranți au fost utilizați în industria textilă, dar (în trecut) şi în industria alimentară. Mai cunoscuți sunt derivații monometilat (MAB) şi dimetilat (DAB) care prezintă o activitate biologică specifică. Se cunoaşte că MAB poate realiza cu guanina din DNA legături covalente. Metabolizarea MAB se realizează la nivelul microsomilor hepatici rezultând forma biologic-activă. Astfel, cu deoxiriboguanozina din DNA poate forma aductul: 8-deoxiguanozil-N-metil-4-amino-azobenzen, notat C_8dGu-MAB.

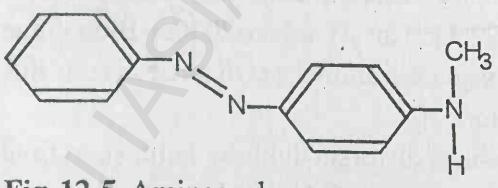


Fig. 12-5. Aminoazobenzen

BCU IAŞI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

B. Ioni metalici cu potențial toxicogen

Ionii metalici (M^{n+}), îndeosebi ionii metalelor grele și ionii metalelor trivalente - considerați ioni cu potențial toxicogen - prin interacția cu DNA pot induce, de asemenea, procese mutagene, oncogene și teratogene (McIntyre și Mills, 1977; Wilson și Fraser, 1977; Wassom, 1980). În general, interacția dintre metale și macromolecula de DNA se produce la nivelul legăturilor fosfodiesterice - situație caracteristică îndeosebi biometalelor și la nivelul nucleobazele intracatenare - situație caracteristică așa numitelor metale cu "potențial toxicogen", e.g. Cd, Hg și Al, ș.a..

Tranzitul ionilor metalici (M^{n+}) spre DNA nuclear, ioni ulterior implicați în procese fizico-chimice cu marcate efecte biochimice sau patobiochimice și evident fiziologice și fiziopatologice, a fost explicat de Sissoeff et al (1976). În concepția acestor autori tranzitul este explicitat prin existența unui schimb natural (difuziune și pompare transmembranală în gradient de concentrație) și a unui schimb patologic (fig. 12-6).

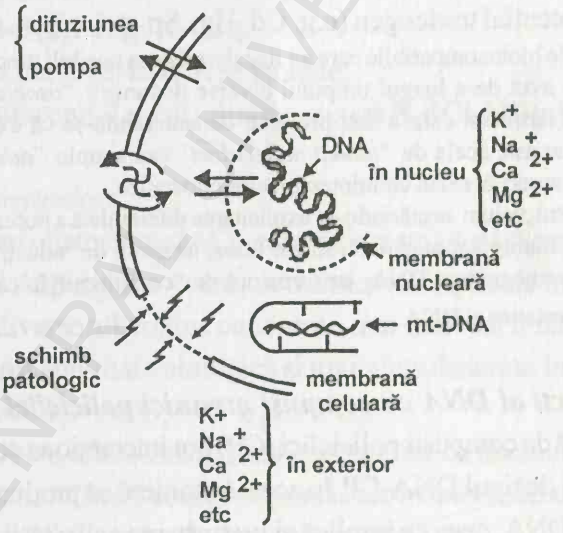


Fig. 12-6. Reglarea interrelației dintre concentrațiile cationice extracelulare și intracelulare (după Sissoeff et al., 1976)

Schimbul patologic asigură traversarea membranei nucleare, ajungându-se în final la structurile cromosomale, recte la DNA nuclear. În acest mod se declanșează interacția M^{n+} cu DNA in vivo, cu efecte asupra procesului de sinteză a biomacromoleculei urmate de perturbări inerente ale mesajului informațional conținut în secvența nucleotidelor. Acest mecanism, în cazuri limită, poate fi incriminat și în apariția neoformațiunilor bioincompatibile, cu evoluție spre procese mutagene și/sau oncogene.

În acest caz se formează "aducţi" de tipul DNA – M^{n+} (Gârban, 1982). Apariţia acestora poate fi studiată in vitro prin metode magnetochimice e.g.: dicroism circular, dispersie optică rotatorie, şi in vivo prin decelarea modifcărilor cuantumului DNA relevând un prim stadiu al perturbării relaţiei structură chimică – activitate biologică (Eichhorn, 1973; Marzilli, 1977; Littlefield et al., 1993; Pasternak şi Gibbs, 1996). Aceste modificări primare au implicaţii dismorfogenezice fiind considerate iniţiatori mutageni ai cancerului (Flessel, 1979).

12.4.4. ADUCŢI DNA CU COMPUŞI ORGANICI POLICICLICI ŞI CU IONI METALICI

În mecanismul proceselor de carcinogeneză chimică pot interveni compuşi organici policiclici cu structuri diferite. De asemenea, pot interveni ioni metalici, predilect ai metalelor cu potenţial toxicogen (e.g. Cd, Hg, Sn etc).

Structurile bioincompatibile care au fost descrise ca posibili precursori ai proceselor mutagene şi carcinogene au avut de-a lungul timpului diverse denumiri: *"asociaţii moleculare"*, *"complecşi moleculari"*, însă termenul care a fost preferat, considerându-se că explicitează mai bine structura artefactului rezultat este acela de *"aducţi moleculari"* sau simplu *"aducţi"*. Aceiaşi termeni au fost utilizaţi de diverşi autori în cazul chimioterapicelor citostatice.

În prezentul volum urmărindu-se explicitarea diferenţiată a noţiunilor care fac apel la probleme de stereochimie şi biologie moleculară, se vor folosi termenii de "aducţi" în cazul compuşilor formaţi între substanţe carcinogene şi DNA, iar termenul de "complecşi" în cazul compuşilor formaţi între chimioterapice citostatice şi DNA.

A. Aducţi ai DNA cu compuşi organici policiclici

O seamă de compuşii policiclici (CP) pot interacţiona cu macromolecula de DNA generând aducţi de tipul DNA-CP. În acesă manieră se produce modificarea structurală a moleculei de DNA, ceea ce implică şi perturbarea activităţii biologice.

În acest volum sunt descrişi succint principalii compuşi policiclici (CP) care aparţin hidrocarburilor policiclice aromatice (HPA); acetaminoflorenului (AAF); aflatoxinelor (AF); aminobenzenului (AB). Problema interacţiei acestora cu DNA a fost prezentată mai detaliat într-o lucrare anterioară (Gârban et al., 1985).

a) Aducţi ai hidrocarburilor policiclice aromatice

Interacţia hidrocarburilor policiclice aromatice (HPA) cu DNA, care stă la baza efectelor oncogene şi mutagene este precedată de procese degradative metabolice, prin

care se realizează activarea moleculei policiclice şi determină formarea aducţilor de tip DNA-HPA.

Se exemplifică aducţi DNA-HPA, redând legarea HPA la nucleobazele purinice, mai exact la deoxiribimononucleotidfisfaţii (dNMP) din DNA. Notarea deoxiribonucleotidfosfaţilor reziduali - la care s-au legat HPA se face astfel: pentru dAMP se scrie dAn, pentru dGMP se scrie dGn, iar pentru dCMP se scrie dCi (la dTMP nu au fost sesizate legături stabile).

În exemplele prezentate mai jos se redă denumirea aducţilor şi notarea abreviată a acestora. Parantetic se află menţionată şi poziţia compusului în fig. 12-7. Deci în cazul aducţilor DNA cu HPA în cazul benz(a)pirenului, i.e. B(a)P se vor scrie:

- aduct (a): 2'-deoxi-N_2-(7,8,9,10-tetrahidro-7β, 8 α, 9α-trihidroxi-benzon(a)piren-10-il)-guanozină, notată **N_2dGu-B(a)P** (fig 12-7a);
- aduct (b): 2'-deoxi-N_6-(7,8,9,10-)tetrahidro-7β, 8α-trihidroxi-benzon(a)piren-10-il)-adenozina, notată **N_6dAd-B(a)P** (fig. 12-7b);

iar în cazul benz(a)antracenului i.e. B(A)A se va scrie:

- aduct (c): N_4-(benzantracenil-7 metil) citidina, notată **N_4dCi-MB(a)A** (fig.12-7c).

b) Aducţi ai aflatoxinelor

După cum s-a arătat aflatoxinele (AF) - compuşi cu structură cumarinică eliminaţi de unele specii din genul Aspergillus - sunt, de asemenea implicate în etiologia unor procese neoplazice. Din diverse aflatoxine cunoscute, mai frecvent întâlnite sunt AFB_1, AFB_2, AFG_1, AFG_2, a căror activitate biologică şi toxicitate descresc în seria

$$AFB_1 > AFG_1 > AFG_2 > AFB_2.$$

În interacţie cu DNA, aflatoxinele stabilesc legături cu nucleobazele purinice (poziţia N_7), determinând modificări conformaţionale ale macromoleculei de DNA. Se exemplifică aductul format cu aflatoxina B_1 (AFB_1) care este:

- aduct (d): 7-guanozil-dihidroxi-aflatoxina AFB_1, notat **N_7 dGu-AFB_1** (fig.12-7d).

c) Aducţi ai aminoazobenzenului

Aminobenzenul (AB) şi îndeosebi derivaţii monometilat (MAB) şi dimetilat (DAB) prezintă o activitate biologică specifică. Astfel MAB poate realiza cu guanina (la C_8) din molecula de DNA legături covalente.

Biodegradarea MAB se realizează la nivelul microsomilor hepatici, rezultând forma biologic-activă. Astfel, cu deoxiribomonoguanozinmonofosfatul dGMP din DNA (dGu) poate forma aductul specific MAB:

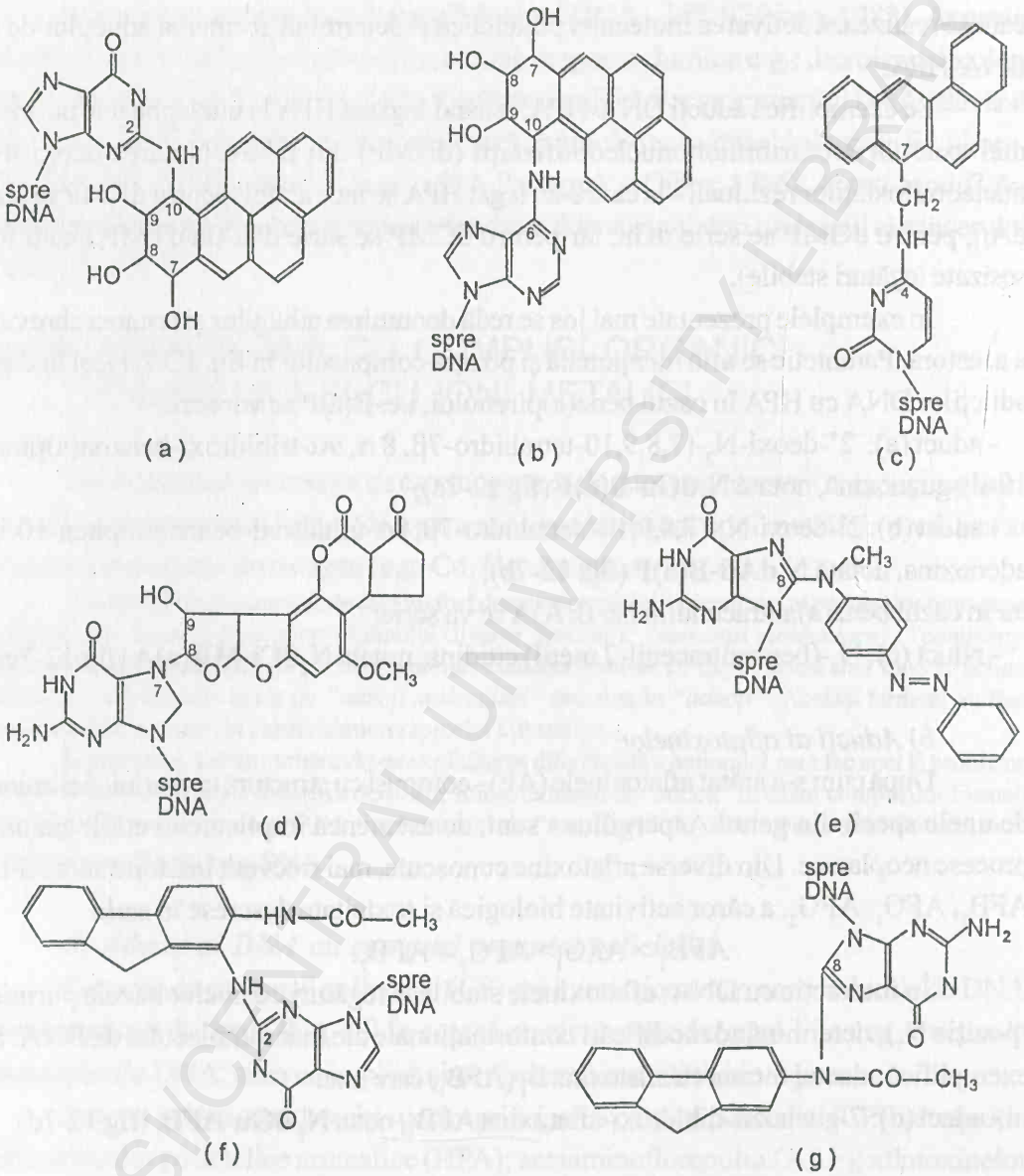


Fig. 12-7. Structura unor aducţi formaţi între nucleobazele din DNA şi diverşi compuşi policiclici (detalii în text):
(a) N_2dGu-B(a)P; (b) N_6dAd-B(a)P; (c) N_4 dCi-MB(a)A;
(d) N_7 d Gu-AFB$_1$; (e) C_8 dGu-MAB; (f) N_2dGu- AAF;
(g) C_8dGu-AAF.

BCU IASI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

- aduct (e): 8-deoxiriboguanozin-N-metil-4-amino-azobenzen, notat **C_8 dGu-MAB** (fig.12-7e).

d) Aducți ai acetilaminofluorenului

Compuși de tipul aducților poate genera și acetilaminoflorenul (AAF) care este o hidrocarbură aminată în poziția C_2 și acetilată la gruparea aminică, formând astfel o structură amidică.

În interacție cu DNA este posibil ca AAF să stabilească legături cu deoxiribonucleozidfosfații dAMP și dGMP fie la nivelul grupărilor aminice, fie la nivelul ciclului aromatic purtător al acestei grupări. Rezultă aducți de tipul:

- aduct (f): acetamido-3-(2'-deoxi-N_2-guanozil)-fluoren, notat **N_2 dGu-AAF** (fig 12-7f)
- aduct (g): acetamido-N-(2'-deoxi-8-guanozil)-fluoren, notat **C_8 dGu-AAF** (fig 12-7g).

Existența aducților confirmă realizarea injuriei biochimice la nivelul DNA și determină destabilizarea macromoleculei prin extensia și distorsia dublului helix. Astfel, conformația dublu helicală înregistrează o modificare structurală, ceea ce implică și perturbarea activității biologice. Din acest considerent, informația biologică existentă în secvența deoxiribonucleotidelor din DNA nu se poate decodifica în mod normal și este afectată transmiterea ei în succesiunea proceselor de replicație, transcripție și translație. Leziunile macromoleculei DNA pot premerge astfel,apariția proceselor teratogene, mutagene și oncogene (Herman, 1974; Lemoine și Wright, 1993).

B. Aducți ai DNA cu ioni metalici cu potențial toxicogen

O privire generală asupra problemelor legate de extinderea cercetărilor asupra relației structură chimică-activitate biologică în cazul aducților de tipul DNA-M^{n+} relevă faptul că după 1970 s-au efectuat studii asupra aspectelor fizico-chimice ale aducților și asupra consecințelor biogenezei acestora cu implicații benefice e.g. stabilizarea macromoleculei de DNA de către unele metale, sau cu efecte nocive, e.g. formarea unor structuri bioincompatibile care perturbă sinteza proteică. Aceasta era urmată de modificări în desfășurarea ciclului celular și efecte mutagene, carcinogene și teratogene (Wilson și Fraser, 1977; Kazantsis și Lorna, 1979; Bayersman, 1994; Gârban, 1996).

Complecșii rezultați în urma interacțiunii dintre DNA și ionii metalici prezintă diverse tipuri de legare: I) la gruparea fosfodiesterică; II) între o grupare fosfodiesterică și nucleobaze; III) între două nucleobaze complementare intracatenare; IV) între două nucleobaze vicinale; V) în diferite poziții ale aceleași nucleobaze purinice (Gârban, 1999b).

Chelatarea internă a ionilor metalici, exemplificată la ioni divalenţi (M^{2+}) se realizează între nucleobaze complementare şi prezintă o dispunere intrahelicală. Astfel în cazul că M^{2+} chelatează A-T legarea apare la N_1 adeninic şi N_3 timinic, iar în cazul chelatării G-C legarea apare la N_1 guaninic şi N_3 citozinic. În fig. 12-8 se prezintă chelatarea la perechea G-C.

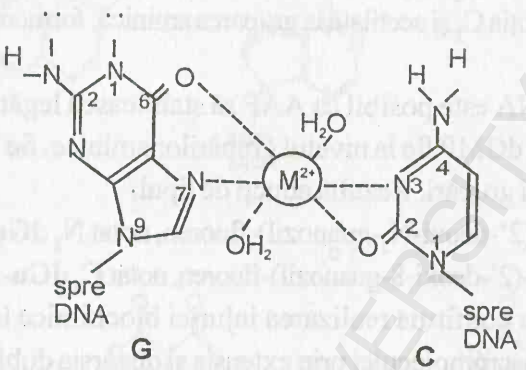


Fig. 12-8. Chelatare internă între M^{2+} şi perechile de nucleobaze complementare G-C (formare de aducţi M^{2+}-pereche G-C)

Primul tip este caracteristic pentru Hg^{2+}, iar secundul pentru Cu^{2+} şi Cd^{2+}. Este, de asemenea posibilă legarea la N_7 guaninic, N_3 citozinic şi la O de la C_6, respectiv C_2.

Un alt tip de chelatare poate să apară la nivelul nucleobazelor vicinale între N_7 şi O de la C_6 (fig. 12-9). Asemenea legături sunt caracteristice pentru ionii Cu^{2+} şi Hg^{2+}.

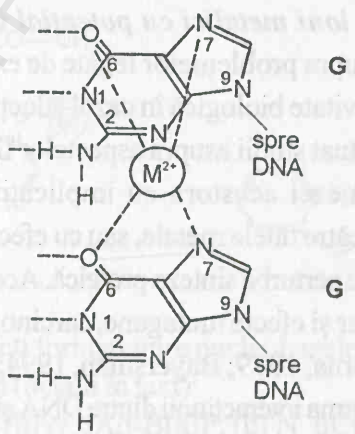


Fig. 12-9. Chelatarea internă între M^{2+} şi nucleobazele vicinale G şi G dispuse pe paliere diferite (formare de aducţi M^{2+} cu nucleobazele G şi G)

BCU IAŞI/CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Se remarcă faptul că la concentrații crescute și biometalele se comportă ca metalele cu potențial toxicogen.

În continuare se prezintă diferite aspecte experimentale în care s-a studiat acțiunea unor ioni metalici și observațiile realizate prin aceste studii.

Într-un studiu, Littlefield et al. (1994) a examinat influența Mg în combinație cu Ni și Cd asupra injuriei moleculei de DNA. Scopul studiului era evaluarea influenței Mg în diminuarea efectelor toxice ale Ni și Cd asupra DNA. Concluziile studiului au fost: Ni nu este direct toxic față de DNA; Cd are efect direct asupra DNA; Mg interacționează cu unele metale grele toxicogene și alterează procesul tumorigenic.

Hartwig și Beyersmann (1989) au evidențiat că $NiCl_2$ prezintă activitate mutagenă asupra celulelor V79 ale hamsterului chinezesc. Mai mult, $NiCl_2$ relevă un efect pronunțat comutagenic față de radiația UV, intensifică citotoxicitatea cisplatinei de aproximativ 12 ori. Aceste observații sugerează inhibarea reparației DNA de către Ni^{2+} prin înlocuirea altor metale divalente esențiale în procesele de reparare și regulare.

Rolul metalelor în carcinogeneză și genotoxicitate a fost, de asemenea, studiat de Beyersmann (1994). El a relevat dependența carcinogenității și genotoxicității Cd^{2+}, Cr^{2+}, Co^{2+} și Ni^{2+} de liganzii chimici care modulează biodisponibilitatea și reactivitatea cu ținte biochimice. Metalele carcinogene Cd, Cr și Ni, inhibă repararea DNA afectat direct de agenți genotoxici (radiații UV, substanțe alchilante).

Apoptoza - moartea celulară programată - este precedată de fragmentarea DNA, conform studiilor efectuate de Barbieri et al. (1992) prin electroforeză pe gel de agaroză.

Tsukube et al. (1994) a investigat relația dintre conținutul citosolic și nuclear de calciu în ischemia miocardică. Rezultatele obținute indică faptul că la ischemia ambele valori ale calciului sunt augmentate, iar creșterea calciului nuclear este asociată cu o fragementare nucleară mărită a DNA. Folosirea Mg și a unui tratament care asociază Mg-K reduce acumularea nucleară de calciu și scade fragmentarea nucleară.

Studii de biologie moleculară efectuate de Park și Kohel (1994) privind influența concentrației de $MgCl_2$ asupra produșilor din reacția de amplificare în lanț a polimerazei (PCR) relevă că o concentrație optimă de $MgCl_2$ pentru fiecare primer este independentă de raportul GC/AT al primerului și numărul de legături DNA amplificate.

Un studiu relativ recent propus de Clark și Eichhorn (1995) sugerează folosirea Cu^{2+} pentru facilitatea accesului DNA în cromatină. S-a stabilit că Cu^{2+} se leagă de DNA așa încât destabilizează dublul helix și produce ruperea legăturilor de hidrogen dintre nucleobaze. Acest proces este facilitat de schimbarea temperaturii de tranziție care afectează structura histonelor H-1 și reacția cu ionii metalici divalenți care se leagă la grupările fosfat, e.g. Mg^{2+}, Mn^{2+} sau Co^{2+}.

12.5. XENOBIOTICE DE INTERES FARMACEUTIC UTILIZATE ÎN CHIMIOTERAPIA CITOSTATICĂ

12.5.1 PRIVIRE SINOPTICĂ

Cercetările în domeniul biochimiei şi biologiei moleculare (Lemoine şi Wright, 1993; Cortner şi Woude, 1997; Lippert, 1999) referitoare la interacţia DNA cu diverşi compuşi chimici, dincolo de interesul pentru etiopatogenia diverselor afecţiuni (şi în mod special a neoplasmelor), prezintă importanţă şi pentru farmacologie.

Sub aspect farmacologic s-au efectuat cercetări asupra interacţiei DNA cu diverse medicamente, interesând în mod general oncoterapia şi, în mod special, chimioterapia citostatică.

Astfel, a fost studiat mecanismul de acţiune al unor agenţi antitumorali cum ar fi: compuşii alchilanţi, e.g.: compuşii azotiperitici - între care mai importantă este ciclofosfamida (Lindemann şi Harbers, 1980; Beretta, 1983; Pană et al., 1983; Gârban et al., 1990; Johnsson et al., 1995); complecşii platinici, e.g.: cis-platina şi oxali-platina (Rosenberg, 1965; Theophanides, 1980; Reedjik et al., 1984; Gârban et al., 1986a); diverse antibiotice, e.g.: adriamicina, daunorubicina, bleomicina (Waring, 1981) etc.

În contextul general al problematicii chimioterapiei se menţionează că studiile asupra mecanismului de acţiune la nivel molecular au fost extinse asupra aspectelor "metabolizării"(biodegradării) medicamentelor. Astfel, s-a decelat existenţa grupărilor "farmacologic-active" care, se integrează în căile biochimice ale metabolismului nucleoproteidelor şi altor bioconstituenţi protidici. În ultimele trei decenii ale secolului XX s-a intensificat studiul problemelor de cronobiochimie şi cronofarmacologie (Garcia-Sainz şi Halberg, 1966; Morgans şi Burns, 1984; Smaaland et al., 1991).

Această manieră de abordare a problemei acţiunii citostaticelor a relevat importanţa relaţiei cronobiochimie - cronofarmacologie şi aplicaţiilor terapeutice în corelaţie cu metabolismul DNA cu cinetica ciclului celular, deci a perspectivelor cronofarmacologiei clinice.

În general interacţia dintre diverse medicamente citostatice şi DNA a constituit o preocupare importantă atât pentru cercetarea fundamentală (biologie moleculară, cronobiochimie, farmacologie experimentală, citologie etc.), cât şi aplicativă (farmacologie clinică, cronofarmacologie, farmacotoxicologie etc.). Aspectele moleculare ale acţiunii anticancerigene au constituit o direcţie de cercetare importantă în perspectiva elucidării mecanismelor de interacţie ale DNA cu chimioterapice citostatice şi a implicaţiilor clinice ale terapiei în oncologie (Lemmer, 1989; Neidle şi Waring, 1993).

Dintre chimioterapicele citostatice, în acest volum, se vor discuta câteva aspecte referitoare la mecanismul de acţiune al ciclofosfamidei - Cp şi cisplatinei - cDDP.

12.5.2. ACIDUL DEOXIRIBONUCLEIC ÎN CHIMIOTERAPIA CITOSTATICĂ

Aspectele de biologie celulară şi moleculară, asociate cu probleme de biochimie şi farmacologie interesează anumite conexiuni cu problematica cronobiochimiei şi cronofiziologiei şi, nu în ultimul rând, al cronofarmacologiei. Acţiunea chimioterapicelor citostatice se desfăşoară în cadrul unei serii de faze specifice ciclului celular şi interesează interacţiile la care participă acidul deoxiribonucleic (DNA) ceea ce explicitează, în parte, rolul acestuia în patobiochimie şi farmacologie.

A. Observaţii privind citocinetica şi farmacologia - implicarea DNA.

Referitor la derularea ciclului celular, domeniu circumscris de citocinetică, există unele observaţii interesante care se pot face între fazele ciclului celular şi modul de acţiune al diverselor chimioterapice cu acţiune citostatică.

Nucleul, parte esenţială a aparatului genetic, evidenţiază modificări morfofiziologice specifice fazelor ciclului celular (mitotic). Prin studii de citofotometrie şi microautoradiografie s-a conchis că există fazele: *de presinteză* G_1 – în care aparent nu se produce biosinteza DNA pentru reproducerea celulară, iar sinteza RNA şi a proteinelor continuă normal (la finele perioadei G_1 pasajul G-S, se declanşează sinteza activă a DNA); *de sinteză S* – în cursul căreia se produce o sinteză a DNA, cantitatea acestuia dublându-se; *de post-sinteză* G_2 (numită şi premitotică) – în care sinteza DNA încetează în timp ce sinteza RNA şi a proteinelor continuă; *de mitoză M* – în care viteza biosintezei RNA şi a proteinelor este mult diminuată, iar materialul genetic se repartizează între celulele fiice. S-a descris, de asemenea, o *fază de repaus* G_0 a ciclului celular în care celulele, de fapt în afara ciclului, sunt capabile de proliferare. Acestea sunt celulele care, de cele mai multe ori, sunt refractare la chimioterapicele citostatice (Skipper, 1971; Mathe şi Muggia, 1980; Chiricuţă, 1984; Cortner şi Woude, 1997).

Deci, se poate estima că în ciclul celular există un compartiment proliferativ cu fazele de mitoză G_1, sinteza S, postsinteza G_2 şi un compartiment neproliferativ cu faza G_0.

Diagrama fazelor ciclului celular redată în fig. 12-10 (după Salmon şi Apple, 1976), evidenţiază acţiunea unor medicamente chimioterapice anticanceroase. Acestea se deosebesc, în principal, prin mecanismul de acţiune, distingându-se chimioterapice: cu acţiune *specifică în ciclul celular* (*SCC*); cu acţiune *nespecifică în ciclul celular* (*NSCC*).

Se remarcă faptul că agenţii chimioterapici cu acţiune *specifică în ciclul celular* (SCC) prezintă particularităţi ale mecanismului de acţiune, caracteristic fiind faptul că

o parte din aceştia pot evidenţia toxicitate selectivă faţă de celulele în curs de proliferare. Medicamentele cu acţiune SCC au o eficienţă mai mare în hemopatiile maligne şi în alte tumori cu rată de proliferare înaltă.

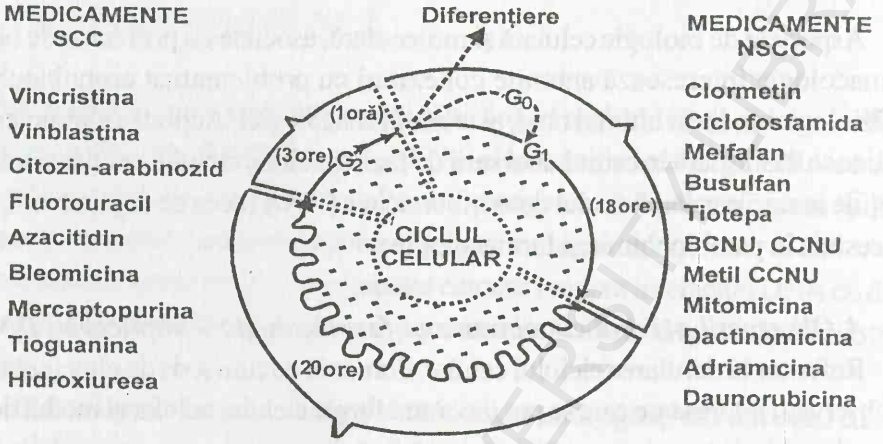


Fig 12-10. Ciclul celular şi agenţii chimioterapici - mecanisme de acţiune (după Salmon şi Apple, 1976).
a) SSC - specifice în ciclul celular; b) NSCC - nespecifice în ciclul celular

Agenţi chimioterapici cu acţiune *nespecifică în ciclul celular* (NSCC) interacţionează, în majoritatea cazurilor, cu DNA şi sunt mai frecvent utilizate în chimioterapia tumorilor solide. Această grupă include şi numeroase azotiperite a căror acţiune este independentă de faza ciclului celular (Skipper, 1971; Neidle şi Waring, 1993; Teicher, 1997).

Dependenţa de fază a ciclului celular (fazo-dependenţa) în acţiunea indusă de chimioterapicele citostatice reprezintă una din problemele de importanţă majoră în clinica oncologică. Fenomenul vizează potenţarea acţiunii citostaticelor în cazul administrării într-o anumită fază a ciclului celular.Aprofundarea investigaţiilor privind fazo-dependenţa a condus la constatarea că se obţine o eficienţă crescută în cazul administrării: în *faza M*-vincristina, vinblastina; în *faza* G_1-adriamicina, L-asparaginaza; în *faza* G_2 – bleomicina; în *faza S*-methotrexat, 5-fluorouracil, 6-mercaptopurina; în *toate fazele*-BCNU, ciclofosfamida; *independent de fază* implicit în faza G_0 – clormetina.(Mathé şi Muggia, 1980; Mulvihill et al., 1977).

În prezent se cunoaşte faptul că agenţii chimioterapici anticanceroşi dovedesc selectivitate citotoxică mai mare pentru celulele canceroase comparativ cu celulele normale. Selectivitatea rezidă, foarte probabil, în diferenţele de cinetică celulară dintre ţesuturile normale şi ţesuturile canceroase. Cinetica populaţiilor celulare oferă un mijloc de înţelegere a sensibilităţii unor tumori la medicamente.Celulele tumorale pot prolifera mai rapid (sau mai puţin rapid) comparativ cu celulele normale. Astfel, mare parte din celulele tumorale se pot afla în fazele sensibile la acţiunea chimioterapicelor citostatice. Totuşi aceste observaţii nu explică toate succesele şi toate eşecurile chimioterapiei.

B. Observaţii privind cronobiochimia şi cronofarmacologia

Variaţiile circadiene ale proceselor metabolice sunt relevate de cronobiochimie. Existenţa acestor variaţii este o expresie a existenţei bioritmurilor (v.Cap.11). Cronobiochimia oferă date cantitative asupra relaţiilor care se stabilesc în timp, în cadrul bioritmurilor. Astfel, cercetări asupra fenomenelor biodinamice la plante şi animale, au evidenţiat că în cursul unei zile se produc modificări biochimice şi biofizice care au un caracter periodic şi sunt predictibile.

Primele observaţii de cronobiologie se consideră că au fost efectuate de Mairan în 1729 care, a remarcat că plantele de mimosa (Mimosa sp.) se deschid în cursul zilei şi se închid în cursul nopţii. Faptul că acest fenomen este dependent de relaţia lumină-întuneric a condus la ideea că ritmul este endogen. Mult mai târziu, după aproape două secole, Johnson în 1926 remarcă faptul că şi la animale (observaţii efectuate pe şoareci) există modificări de ritm circadian. Pornind de la această remarcă, autorul a postulat faptul că există un "ceas intern fiziologic" independent de fluctuaţiile condiţiilor de mediu.

În prezent, se consideră că există "gene-ceasornic" (clock-genes) care controlează existenţa unor mecanisme moleculare ale proceselor cronobiochimice. Studii asupra existenţei de "gene-ceasornic" au fost efectuate de Konopka şi Benzer (1971) la Drosophila melanogaster. Autorii au izolat trei mutante care modifică drastic bioritmul circadian la Drosophila, i.e. o mutantă care induce aritmia, o mutantă care scurtează bioritmul circadian la 19 ore şi alta care creşte acest bioritm la 24 ore. Aceste mutante intervin în activitatea "prezumptivelor gene-ceasornic" (engl. "putative clock-genes"). Mutantele intervin în ritmul circadian al ecloziunii populaţiilor de insecte şi în activitatea locomotorie individuală.

Proprietăţile fundamentale ale ritmurilor biologice rezidă în: a)originea endogenă de natură genetică; b) persistenţa necondiţionată de evoluţia în timp; c)posibilitatea de-a fi influenţată regulat de variaţiile ciclice ale anumitor factori de mediu denumiţi "sincronizatori" (engl.syncronizers; germ. zeitgebers). Această sincronizare se poate întâlni atât la plante cât şi la animale.

O interesantă remarcă referitoare la chimioterapia antineoplazică s-a făcut în legătură cu faptul că în cazul neoplasmelor există o sinteză crescută de poliamine. Astfel că Durie et al. (1977) consideră că poliaminele sunt markeri în boala neoplazică şi în chimioterapia acesteia.

Din punctul de vedere al cronobiochimiei modificările relevă două atribute esenţiale: primul - modificările produse în timp sunt reproductibile şi chiar cunatificabile; secundul - variaţiile temporale pot fi sesizate la nivelul anumitor ţesuturi şi lichide biologice. Astfel se poate conchide că datorită atributelor menţionate, variaţiile temporale (e.g. cuantumul anumitor metaboliţi), au caracter reproductibil şi predictibil. Acest aspect a fost stabilit şi experimental.

Particularităţile cronobiochimice circadiene - în principal biosinteza nucleoproteidelor şi acizilor nucleici - şi variaţiile predictibile ale homeostaziei diverşilor metaboliţi, au făcut posibilă şi constituirea unui domeniu al farmacologiei, numit "*cronofarmacologiei*". Astfel, în cazul agenţilor antineoplazici s-a urmărit cunoaşterea principalelor variaţii faramcocinetice şi farmacodinamice în cursul a 24 ore.

În general, sub raport farmacocinetic au fost studiate variaţiile circadiene - reproductibile şi predictibile - referitoare la absorbţia, distribuţia, compartimentarea metabolismului şi eliminarea diverselor medicamente (Reinberg şi Smolensky,1982). Aceste aspecte au fost tratate mai pe larg în cadrul unui volum referitor la cronofarmacologie în care abordează interacţiile la nivel molecular şi celular (Lemmer, 1989).

În finalul acestui capitol se prezintă câteva date referitoare la cronofarmacologie exemplificând modul de utilizare recomandat pentru unele chimioterapice citostatice.

De la datele prezentate mai sus, cu caracter istoric, la studiul aprofundat al problemelor de cronobiologie, cronobiochimie, cronofarmacologie, cronotoxicologie (în relaţie cu xenobioticele), nu a fost decât o chestiune de timp.

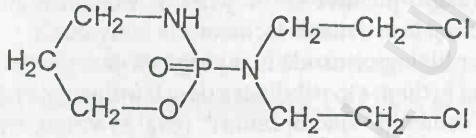
12.5.3. INTERACŢIA UNOR CHIMIOTERAPICE CITOSTATICE CU DNA

Creşterea eficienţei terapeutice şi realizarea unei strategii superioare implică abordarea aspectelor celulare şi moleculare caracteristice oncogenezei şi oncoterapiei Mulvihill et al., 1977; Waring, 1981; Chiricuţă, 1984; Gârban et al., 1986).

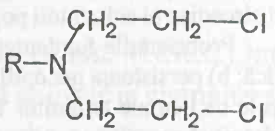
În acest context, o majoră importanţă are cunoaşterea mecanismelor de interacţie la nivel molecular şi a particularităţilor farmacocinetice şi farmacodinamice ale chimioterapicelor citostatice (numite cu un termen generic "agenţi antineoplazici") urmărindu-se elucidarea efectelor la nivelul celular şi tisular.

Pentru explicitarea mecanismelor moleculare ale interacţiei chimioterapicelor citostatice cu DNA se vor prezenta date referitoare la ciclofosfamidă (Cp) şi cis-platină (cDDP).

Ciclofosfamida. Are denumirea chimică 2 bis-(β-cloretil)amino-1-oxa-3-aza-2 fosfociclohexan-2-oxid (fig.12-11) şi se notează uzual prin Cp. Este cunoscută în tratatele de Farmacologie şi Oncologie sub numele de Endoxan; Cytoxan; Clafen; NSC 26271; Ciclofosfan



(I)



(II)

Fig. 12-11. Ciclofosfamida: 2 bis-(β-cloretil)amino-1-oxa-3-aza-2 fosfociclohexan-2-oxid
(I) Formula structurală (evidenţiază nucleul heterociclic şi gruparea azotiperitică);
(II) Formula generală ; (R - nucleul heterociclic al ciclofosfamidei)

În cursul interacţiei Cp cu DNA se va elibera un atom de clor rezultând un monoalchilderivat sau ambii atomi de clor, rezultând un dialchilderivat.

Cis-platina. Este cunoscută sub numele de cis-diclorodiaminoplatina, notată fiind uzual prin cDDP. Acest compus este agentul antineoplazic platinic cu maximă activitate citostatică. Este caracterizat printr-o geometrie planară, are doi liganzi inerţi ($2NH_3$) şi doi liganzi labili ($2Cl^-$), care se eliberează prin hidroliză (fig.12-12).

Procesul de hidroliză al cis-platinei (I) poate conduce până la un produs monoacvatat (II) sau unul diacvatat (III). Aceste două specii moleculare instabile pot conduce la formarea unor resturi de liganzi monodentat (IV) sau bidentat (V). Aceşti

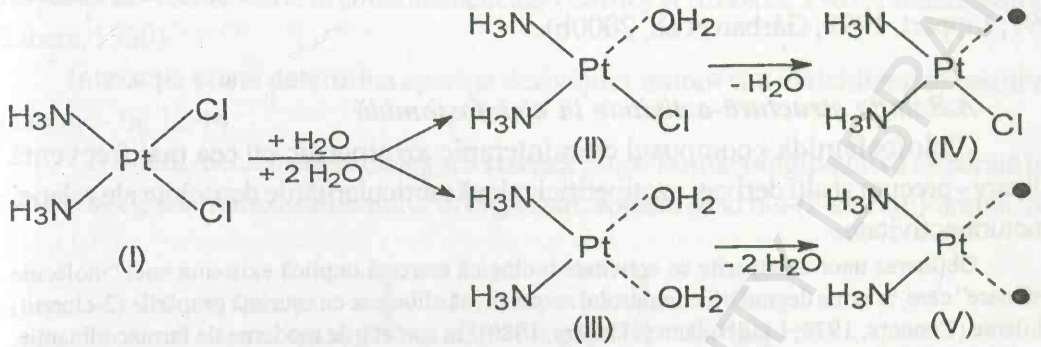


Fig.12-12. Cis-platina (cis-diclorodiaminoplatina) - formula structurală şi căile de hidroliză specifice

liganzi se pot lega de guanina din macromolecula de DNA. În funcţie de ligandul angajat în legarea la DNA se pot forma două tipuri de complecşi.

Acţiunea acestor agenţi antineoplazici asupra biosintezei DNA se explică prin interacţia care are loc in vivo şi a cărei principală caracteristică rezidă în formarea unor complecşi (aducţi). Interacţia se poate realiza cu DNA în cursul replicaţiei semiconservative,dar se consideră că procesul poate afecta şi deoxiribonucleotidele precursoare.

Aprofundarea acestor probleme în cazul Cp şi cDDP a permis o mai bună cunoaştere a efectelor citostatice şi implicit utilizarea mai eficientă a acestora în cadrul unei strategii chimioterapice complexe.

12.5.4. COMPLECŞI DNA-CITOSTATICE

În mod curent, în chimioterapia antineoplazică se utilizează o mare gamă de produse medicamentoase aparţinând diverselor clase: compuşi alchilanţi (ciclofosfamida, clorambucil, nitrozoureea etc.); antimetaboliţi şi (methrorexat, analogi purinici: 6 – mercapopurina, 6 – tioguanina şi pirimidinici: 5 - fluorouracil); hormoni steroizi (androgeni şi estrogeni); antibiotice (adriaminicina, bleomicina, dactinomicina, mitomicina etc.); fitoalcaloizi (vincristina sau oncovin, vaniblastina etc.) alte citostatice (cis-platina, hidroxiureea etc.). O parte din chimioterapicele citostatice interacţionează cu DNA sau cu precursori ai acestuia

Cu titlu informativ se menţionează că principalele modalităţi ale arsenalului terapeutic antitumoral rezidă în: intervenţia chirurgicală, radioterapie, chimioterapie şi imunoterapie. Chimioterapia – azi domeniu distinct – a fost utilizată iniţial ca o procedură de selecţie în stări terminale. Ulterior utilizarea acesteia s-a extins de la formele tardive de boală la formele cu risc crescut de metastazare.

Interacţia ciclofosfamidei (Cp) care conţine gruparea bis-(2-cloretil)-aminică cu DNA prezintă similitudini cu interacţia dată de cis-platină (cDDP) cu DNA (Gârban et al., 1990). Aceasta pentru considerentul că azotiperita este un agent alchilant difuncţional, iar cis-platina conţine un atom de Pt divalent care poate stabili de asemenea două legături cu DNA.

Ambele medicamente citostatice realizează una sau două legături cu macromolecula de DNA. Se formează astfel complecşi (aducţi) de tipul "DNA-chimioterapice citostatice"

care, pot induce la final, efecte de cross-link (Waring, 1981; Dancău et al., 1985; Teicher, 1997; Lippert, 1999; Gârban et al., 2000b).

A. Relația structură-activitate la ciclofosfamidă

Ciclofosfamida - compusul chimioterapic azotiperitic cu cea mai frecventă utilizare - precum şi alți derivați azotiperitici relevă particularitățile deosebite ale relației structură-activitate.

Obținerea unor azotiperite cu activitate biologică marcată implică existența unei "molecule purtătoare" care, în urma degradării compusului respectiv, să elibereze cu ușurință grupările (2-cloretil) alchilante (Connors, 1974; Lindermann şi Habers, 1980). În cercetările moderne de farmacodinamie, bazate pe studii fizico-chimice şi histochimice, interacția farmacon-receptor este abordată în contextul relației structură chimică-activitate biologică. Azi se admite faptul că la compuşii chimioterapici se poate distinge o "grupare suport" care asigură afinitatea selectivă pentru substratul biologic şi o "grupare reactivă" care determină tipul activității, i.e. specificul farmacologic-activ. În cazul Cp gruparea reactivă este bis-(2-cloretil)-amina.

Mecanismul interacției azotiperitelor cu DNA, care explică efectele citostatice evidențiază două posibilități de legare: la grupările fosfodiesterice: la nucleobaze, în deosebi la guanină.

Posibilitatea legării azotiperitelor, în speță a Cp, la grupările fosfodiesterice externe din dublul helix al DNA este redată în fig.12-13.

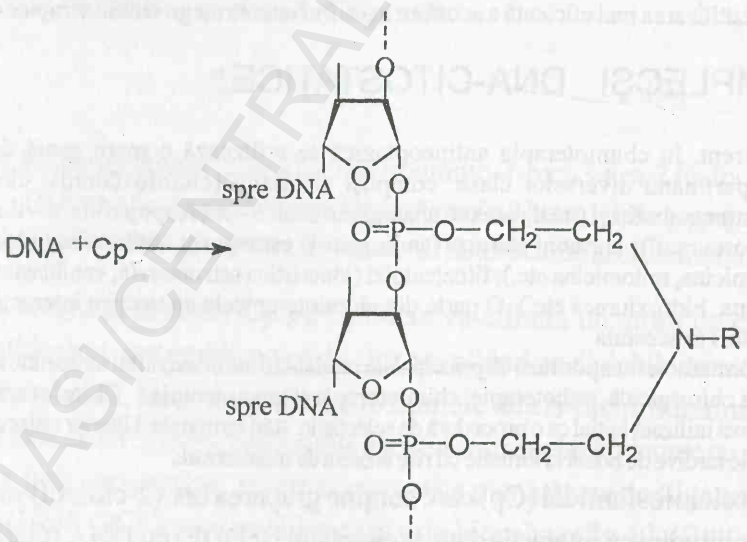


Fig. 12-13. Interacții ale Cp cu legare la nivelul grupărilor fosfodiesterice din DNA

Legarea Cp la nucleobaze din interiorul dublului helix este determinată de capacitatea acestora de fixare la atomul N_7 al guaninei, centrul puternic nucleofil cu maximă accesibilitate

din punct de vedere steric în structura helicală (Lawley şi Brookes, 1967; Lindermann şi Habers, 1980).

Interacţia poate determina apariţia derivaţilor mono- sau dialchilanţi ai restului guaninic - fig.12-14.

Evident mecanismele de legare vizează grupa farmacologic-activă eliberată în urma biodegradării medicamentului în organism, aceasta fiind bis-(2-cloretil)-amina. În

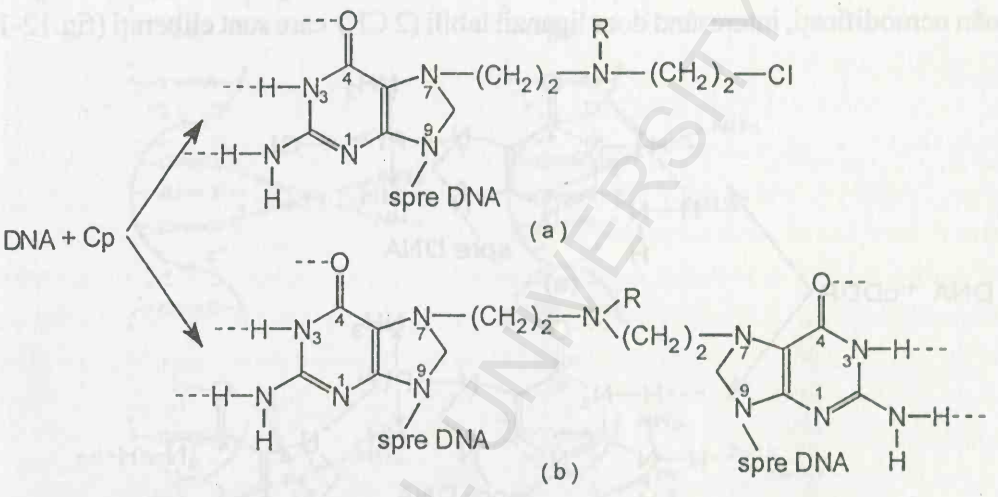


Fig. 12-14. Interacţii ale Cp cu legare la guanina din macromolecula de DNA
a) mono(alchil)guanin-derivat; b) di(alchil)guanin-derivat

cursul metabolizării este afectată şi gruparea transportoare. Se menţionează la unele azotiperite şi existenţa stereospecificităţii în activitatea citostatică, interacţiile moleculare in vivo fiind determinate de activitatea optică.

Asupra modului de legare ale azotiperitelor la DNA, trebuie menţionat faptul că atacul agentului alchilant se poate produce la o singură catenă (mono helical) sau la ambele (dublu helical), în acest mod apărând legăturile intracatenare şi intercatenare. Legăturile intercatenare afectează guanina de pe catene diferite determinând efecte de cross-linking care blochează rapid procesul de replicaţie la DNA (Lawley şi Brookes, 1967; Cionga şi Avram, 1978). Desigur realizarea legăturii alchilant –DNA poate avea caracter monomolecular sau dimolecular (intermolecular).

B. Relaţia structură-activitate la cis-platină

Interacţia cis-platinei cu DNA, aşa cum s-a arătat, este precedată de formarea a două specii de compuşi: un derivat monoacvatat şi un derivat diacvatat. Aceşti derivaţi

pot realiza legături la una sau la ambele catene ale DNA rezultând în final complecşi de tipul DNA-cDDP. Legarea la nucleobaze se face preferenţial în seria: guanină > adenină > citozină, fără a implica timina (Theophanides, 1981; Waring, 1981; Lippert, 1999).

Investigaţii asupra interacţiei DNA cu cDDP relevă posibilitatea formării complecşilor DNA-cDDP (numiţi adesea şi aducţi), care perturbă structura secundară a macromoleculei. Particularităţile stereochimice ale legării implică tranziţia macromoleculei de la forma B-DNA (starea nativă) la formele A-DNA şi C-DNA.

Tranziţiile macromoleculei de DNA nu afectează liganzii inerţi (2 NH_3) care rămân nemodificaţi, interesând doar liganzii labili (2 Cl^-) care sunt eliberaţi (fig.12-15)

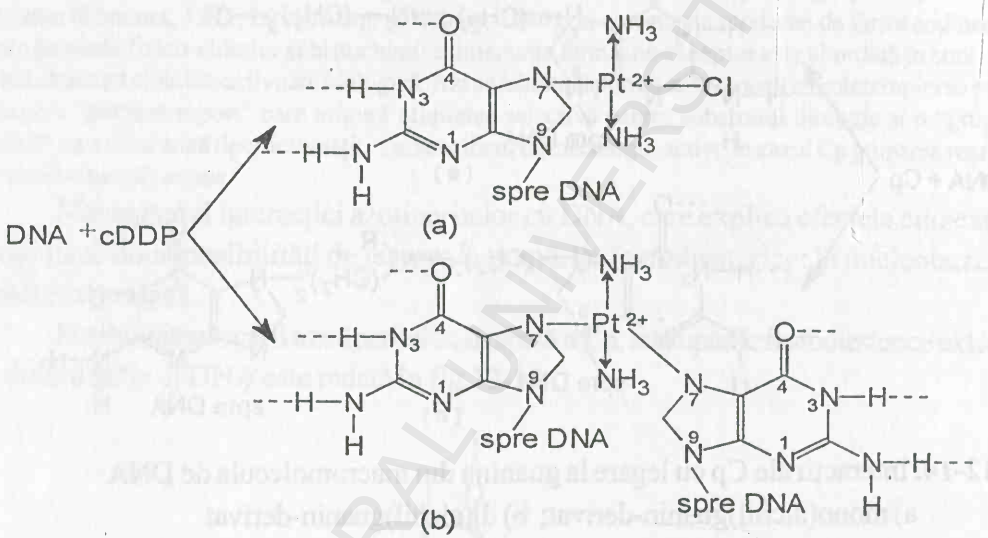


Fig. 12-15. Interacţii ale cDDP cu legare la guanina din macromolecula de DNA
a) fixarea ligandului monodentat; b) fixarea ligandului bidentat

Se menţionează faptul că legarea cDDP se poate face la DNA, rezultând complecşi homomacromoleculari de tipul DNA-cDDP, dar este posibilă, de asemenea, legarea la DNA şi proteine, rezultând complecşi heteromacromoleculari de tipul DNA-cDDP-Proteine. O prezentare generală a acestora se face în fig.12-16. Se remarcă faptul că în urma interacţiilor rezultă complecşi mono- sau bidentaţi.

Pentru investigarea complecşilor DNA-cDDP (numiţi aşa cum s-a arătat şi aducţi) s-au perfectat tehnici de evaluare cantitativă. O astfel de tehnică, perfectată pe ţesuturi izolate de la şoarece, se bazează pe metoda imunohistochimică, care permite vizualizarea şi cuantificarea poziţiilor active ale cDDP, i.e. legăturile la DNA nuclear (Johnsson et al., 1994). Ulterior a fost perfectată şi o metodă de evaluare a distribuţiei cis-platinei în ţesuturi, bazată pe criterii farmacocinetice (Johnsson et al., 1995).

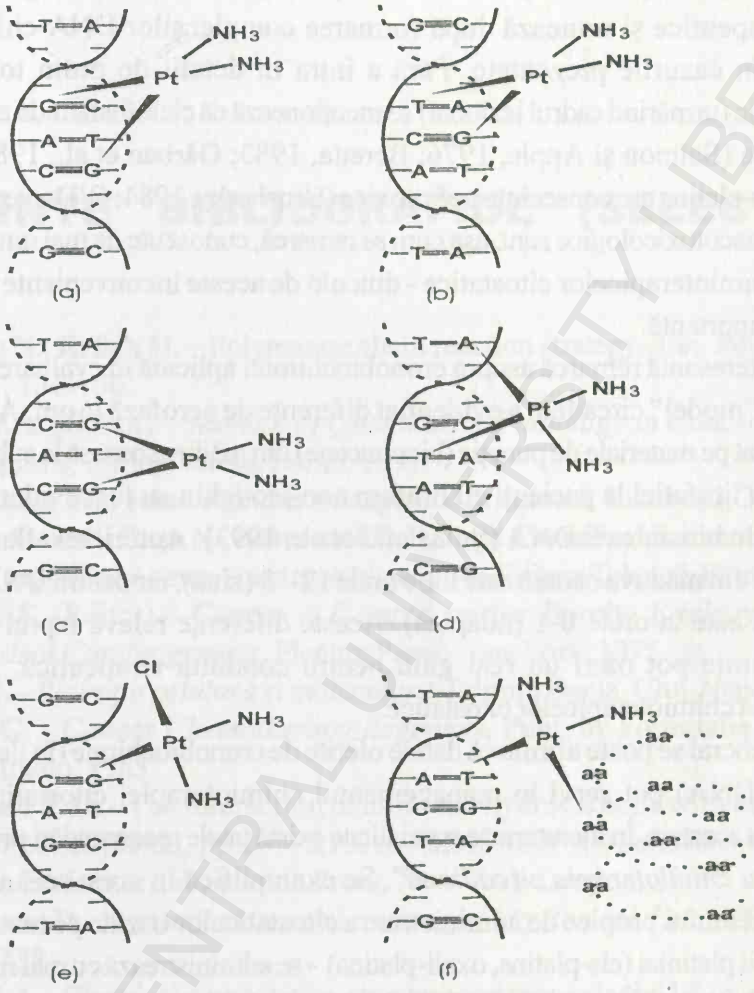


Fig.12-16. Modele sterice de legare a cDDP la DNA sau DNA şi proteine (Gârban, 1997) a) legături intercatenare cu nucleobaze identice; b) legături intercatenare cu nucleobaze diferite; c) legături intracatenare cu nucleobaze identice; d) legături intracatenare cu nucleobaze diferite; e) legătură monofuncţională cu o nucleobază aparţinând uneia din catena DNA; f) legătură heteromacromoleculară între o catenă DNA şi o catenă polipeptidică

Oricare ar fi modul de legare al agenţilor antineoplazici la DNA, efectul final este acelaşi: denaturarea stereostructurii dublu helicale a macromoleculelor DNA, urmată de modificarea activităţii biologice. Interacţia chimioterapicelor citostatice discutate (ciclofosfamida şi cis-platina) cu macromolecula poliheteronucleotidică a DNA, care vehiculează informaţia genetică, implică şi posibilitatea de-a influenţa succesiunea proceselor de replicaţie-transcripţie-translaţie afectând totodată sinteza proteică (Gârban et al., 1998b). Astfel că interacţia la nivel molecular este urmată de modificări la nivel celular şi tisular.

BUCHAREST CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

În final, se impune menţionarea unor aspecte de farmacotoxicologie care însoţesc efectele terapeutice şi urmează după formarea complecşilor DNA-chimioterapice citostatice în cazurile prezentate. Fără a intra în detalii de ordin toxicologic şi patobiochimic (urmărind cadrul lezional) se menţionează că ciclofosfamida are consecinţe hepatotoxice (Salmon şi Apple, 1976; Beretta, 1983; Gârban et al., 1986b; Teicher, 1997), iar cis-platina are consecinţe nefrotoxice (Hrushesky, 1984; O'Dwyer et al., 1997). Efectele farmacotoxicologice sunt, aşa cum se remarcă, cunoscute de mai mult timp, totuşi utilizarea chimioterapicelor citostatice - dincolo de aceste inconveniente - s-a dovedit extrem de importantă.

O interesantă remarcă asupra cronobiochimiei aplicată în evaluarea biosintezei DNA pe un "model" circadian a evidenţiat diferenţe de acrofază la om. Astfel, într-un studiu efectuat pe materiale de puncţie (biopunctate) din măduva osoasă la subiecţi sănătoşi şi din noduli limfatici la pacienţi cu limfom non-Hodgkin au fost evidenţiate variaţii circadiene ale biosintezei DNA (Smaaland et al., 1993). Autorii au aflat că acrofaza pentru DNA din măduva osoasă este între orele 12-13 (ziua), iar pentru DNA din nodulii limfomatoşi este la orele 0-1 (noaptea). Aceste diferenţe relevă faptul că datele de cronobiochimie pot oferi un real ghid pentru conduita terapeutică, recte pentru administrarea chimioterapicelor citostatice.

În general se poate afirma că datele oferite de cronobiochimie (în deosebi nivelul biosintezei DNA) pot servi în managementul chimioterapiei citostatice, urmărind eficientizarea acesteia. În literatura de specialitate există unele recomandări privind "*timpul optim pentru chimioterapia circadiană*". Se exemplifică în acest sens unele referiri asupra momentului propice de administrare a citostaticelor bazate pe rezultate clinice, e.g.: compuşii platinici (cis-platina, oxali-platina) - se administrează cu mai multă eficienţă seara; compuşii alchilanţi (ciclofosfamida) - se administrează preferenţial dimineaţa; antimetaboliţii (5-fluorouracilul, 6-mercaptopurina) - se administrează seara; antibioticele (adriamicina, daunorubicina) - se administrează cu eficienţă crescută dimineaţa. Aceste probleme interesează aspectele de biologie moleculară în relaţie cu cronobiochimia, cronofarmacologia şi evident cronotoxicologia, fiind tot mai mult studiate atât în monocât şi în polichimioterapia citostatică.

B.C.U. "M. EMINESCU" IAȘI

REFERINTE BIBLIOGRAFICE (SELECTIVE)

1. **Arnheim N., Erlich H.** – Polymerase chain reaction strategy. *Ann. Rev. Biochem.*, 1992, 61, 131-156.
2. **Baak J.P.A.** (Editor) – *Manual of Quantitative Pathology in Cancer Diagnosis and Prognosis,* Spring Verlag, Berlin, 1991.
3. **Badea Elena Marcela** - *Plantele transgenice în cultură*, Bucureşti, 2003.
4. **Banu C., Alexe P., Buțu N., Răsmeriță D., Lungu Cornelia, Vizireanu Camelia** – *Aditivi şi ingrediente pentru industria alimentară*, Editura Tehnică, Bucureşti, 2000.
5. **Becker F.F.** (Editor) – *Cancer a Comprehensive Treatise Etiology: Chemical and Physical Carcinogenesis.* Plenum Press, New York, 1975.
6. **Benga G.** - *Biologia celulară şi moleculară*, Editura Dacia, Cluj-Napoca, 1985.
7. **Beretta G.** - *Cancer Chemotherapy Regimens*, Publ. by Formitalia Carlo Erba S.p.A. Milano, 1983
8. **Bergmann E.D.** - The interaction of aromatic hydrocarbons with nucleic acids and their constituents, pp.207- 216, in "*Molecular Associations in Biology*" (Pullman B., Editor), Academic Press, New York-London, 1968.
9. **Beyersmann D.** - Interactions in metal carcinogenicity, *Toxicol. Lett.*, 1994, 71 (1-3), pp. 333-338.
10. **Boffley S.A.** - Chemical composition, structure and properties of DNA, pp. 151-166, in "*Analysis of Amino Acids, Proteins and Nucleic Acids*" - Biotechnology by open learning (James W., Editor), Butterworth -Heinemann Ltd., Oxford-London-Boston- Munich-New Delphi-Singapore-Sydney-Tokyo-Toronto, 1992.
11. **Brookes P., Lawley P.D.** – Reaction of some mutagenic and carcinogenic compounds with nucleic acids. p.111, in "*Symposium on molecular action of mutagenic and carcinogenic agents*", 6-9 April, Oak Ridge, Tennesee, U.S.A., 1964.
12. **Brugge J.** (Editor) – *The origins of human cancer.* CSHL Press, Cold Spring Harbor, 1991.
13. **Caillet Jacqueline, Pullman B.** – On the solubilization of aromatic carcinogens by purines and pyrimidines, pp.217-220, în "*Molecular Associations in Biology*" (Pullman B., Editor), Academic Press, New York-London, 1968.

14. **Caspari W.** - *Nutrition et cancer: Actualités Scientifiques et Industrielles*, Hermann et Cie, Paris, 1938
15. **Celis J.E.** - *Cell Biology: A Laboratory Handbook*, Vol. I - II, Academic Press, New York, 1994.
16. **Champe Pamela C., Harvey R.A.** - *Illustred Reviews: Biochemistry*, J.B. Lippincott Comp., Phyladelphia-London-New York-Sao Paolo-Mexico City-Sydney, 1987.
17. **Chiricuță I.** - Cancerul boală moleculară, pp.323-374, în "*Biologia moleculară şi medicina modernă*", (Fodor O., Editor), Editura medicală, Bucureşti, 1969.
18. **Chiricuță I.** (Editor) - *"Colecția Enciclopedia Oncologică"*, Vol. 5, *Cancerul. - Mediul ambiant şi carcinogeneza,* Publ. de Institutul Oncologic din Cluj-Napoca, 1980.
19. **Chiricuță I.** (Editor) - *Cancerologie*, Vol. 1, *Cancerologie generală*; Vol. 2 - *Cancerologie clinică*, Editura Medicală, Bucureşti, 1984
20. **Cionga E.G., Avram L.C.** - *Medicamente chimioterapice*, Editura Dacia Cluj-Napoca, 1978
21. **Cockburn A.** - Assuring the safety of genetically modified (GM) foods: the importance of an holistic, integrative approach, *J. of Biotech.*, 2002, 98, 79-106.
22. **Constantinescu C.Gr., Hațieganu Elena** - *Biologia moleculară a celulei vegetale*, Editura Medicală, Bucureşti, 1983.
23. **Cortner Janelle, Woude G.F.** - Essentials of molecular biology, pp. 3-33, in *"Cancer. Principles and Practice of Oncology"*, 5th ed. (de Vita V.T. Jr., Hellman S., Rosenberg S.A., Eds.), Lippincott-Raven Publishers, Philadelphia-New York, 1997
24. **Dancău G., Gârban Z., Roth L., Brazdă Maria, Văcărescu G., Nemeş Radița, Siniteanu A.** - Considerații privind acțiunea oncostatică a unor compuşi cu structură azotiperitică, pp. 150-157, în *Simpozionul de Farmacodinamie,* Timişoara 11 mai 1985
25. **Darnell J., Lodish H., Baltimore D.** – *Molecular Cell Biology*, Scientific American Books, New York, 1986.
26. **Drăgan P., Gârban Z.** (Editors) - *Metal Elements in Environment, Medicine and Biology*, Tome I, Publishing House Mirton, Timişoara, 1994
27. **Dumitru I.F., Iordăchescu D.** - *Introducere în enzimologie,* Editura Medicală, Bucureşti, 1981.
28. **Durie B.M.G., Salmon S.E., Russell D.H.** - Polyamines as markers of response and disease activity in cancer chemotherapy, *Cancer Res.*, 1977, 36, 214-221.
29. **Dyer D.G., Dunn J.A., Thorpe S.R., Bailie K.E., Lyons J.T., McCance D.R., Baynes J.W.** - Accumulation of Maillard reaction products in skin collagen in diabetes and aging, *J. Clin. Invest.*, 1993, 91, 2463-2469.
30. **Eichhorn G.L.** (Editor) – *Inorganic Biochemistry,* Vol.I-II, Elsevier, Amsterdam-London, 1973.
31. **Ensminger N.M., Ensminger A., Konlande E.I., Robson J.R.** - *The Concise Encyclopedia of Food and Nutrition*, CRC Press, Boca Raton, Florida, 1995.

32. **Eremia D.** - *Structurile vii sub presiunea timpului*, Editura All, București, 1996.
33. **Erlich H.A.** (Editor) – *PCR technology. Principles and applications for DNA amplification.* Stockton Press, New York, 1989.
34. **Faust M.A., Glenn B.P.** - Animal Feeds Crops Derived Through Biotechnology: *Farm Animal Performance and Safety, in Biotechnology and safety assesment*, III edition, Ed. Thomas J.A., Fuchs R.L., pp.143-189, Academic Press, 2002
35. **Fields N.B., Knipe M.D.** - *Virology*, Vol.I-II, Raven Press Ltd., New York, 1990.
36. **Fodor O.** (Editor) - *Biologia moleculară și medicina modernă*, Vol. I-II, Editura Medicală, București, 1969-1970.
37. **Fresht A.** - *Enzyme structure and mechanims*, 2nd ed., Freeman, New York, 1985.
38. **Gadaleta M.N., Rainoldi G., Lezza A.M., Lilella F., Fracasso F., Cantatore P.** - mt-DNA copy number and mt-DNAs deletion in adult and senescent rat, *Mutat.Res.*, 1992, 275, 181-193.
39. **Garcia-Sainz M., Halberg F.** - Mitotic rhythms in human cancer reevaluated by electronic computer programs. Evidence for chronopathology, *J.Natl.Cancer Inst.*, 1966, 37, 279-292.
40. **Gârban Z., Daranyi Gabriela, Sigartău Gr., Atim Ileana** - Asupra unor mecanisme moleculare admise în geneza leziunii biochimice la nivelul ADN. II. Interacția ADN cu hidrocarburi policiclice aromatice, p.487, în *"Colecția Enciclopedia Oncologică", Vol. 6, Cancerul -Oncologie comparată"* (Chiricuță I., Editor) Publ. de Institutul Oncologic din Cluj-Napoca, 1981.
41. **Gârban Z., Daranyi Gabriela, Popeți Doina, Tămaș Marta, Manu Rodica** - Asupra unor mecanisme moleculare admise în geneza leziunii biochimice la nivelul DNA. IV. Interacția DNA cu aflatoxine., pp. 138-146, în *Anuarul "Lucrări științifice"*, Vol. XIX, Inst. Agr. Timișoara, 1984.
42. **Gârban Z., Holban St., Brazda Maria, Ciubotaru D., Văcărescu G.** – Unele probleme de patologie moleculară în carcinogeneza chimică. I. Interacțiunea acidului deoxiribonucleic cu compuși policiclici. *St. cerc. biochim.*, 1985, 25 (1), 31-40.
43. **Gârban Z., Daranyi Gabriela, Tamas Marta, Miklos J., Borza Iconia, Nemeș Radița, Precob V.** - Investigations on the action of cis-platinum on the deoxyribonucleic acid in vitro and in vivo. *"14th International Cancer Congress"*, Abstracts of Lectures, Symposia and Free Communications, Vol. 3, p.1187, Publ. by S. Karger AG-Basel/Akademiai Kiado Budapest, 1986a.
44. **Gârban Z., Roth L., Ion N., Mărculescu E., Brazdă Maria, Siniteanu A., Neda G.** - Medicamente azotiperitice utilizate în chimioterapia antitumorală. Particularități structurale, mecanism de acțiune., *Timișoara Medicală,* 1986b, 3, 71-84.
45. **Gârban Z., Drăgan P., Daranyi Gabriela, Riviș A., Mareș A., Eremia Iulia** – The effects of cis-platinum and cyclophosphamide on deoxiribonucleic acid, in *"XIth International Symposium on Medical Chemistry"*, Abstracts Volume, p.52, Ierusalem - Israel, September 2-7, 1990.

46. **Gârban Z.** – *Noţiuni de biologie moleculară*, Vol. III, Editura Eurobit, Timişoara, 1996.
47. **Gârban Z., Drăgan P.** (Editors) - *Metal Elements in Environment, Medicine and Biology*, Tome III, Publishing House Eurobit, Timişoara, 1998a.
48. **Gârban Z., Daranyi Gabriela, Avacovici Adina, Moldovan I., Carţiş Ioana** - Changes induced in homeostasis by the action of cis-platinum on the materno-fetal complex., pp. 873-880, in *"Mengen- und Spurenelemente, 18. Arbeitstagung 1998"*, Friedrich Schiller-Universität Jena, (Hrsg.Anke M.et al.), Verlag Harald Schubert, Leipzig, 1998b.
49. **Gârban Z.** – Structural pecularities of the adducts built in the system with deoxyribonucleic acid and metallic ions, pp.880-887, in "*Mengen- und Spurenelemente, 19. Arbeitstagung 1999*", Friedrich-Schiller-Universität Jena, (Hrsg. Anke M. et al.), Verlag Harald Schubert, Leipzig, 1999.
50. **Gârban Z.** - *Nutriţia umană, Vol.I - Probleme fundamentale*, Editura Didactică şi Pedagogică R.A., Bucureşti, 2000a.
51. **Gârban Z., Moldovan I., Avacovici Adina, Daranyi Gabriela** - Structure-activity relationships in case of interaction between cis-platinum and deoxyribonucleic acid., pp.517-522, Papers of "*The first International Congress of the Romanian Society for Cell Biology*", Iasi 7-10 June, 2000 (Crăciun C., Ardelean A., Eds.), Publ. House Risoprint, Cluj-Napoca, 2000b.
52. **Gârban Z., Gârban Gabriela** - Biomedical implications of the adducts biogenesis resulted by the interaction of deoxyribonucleic acid with aflatoxins, *Central European Journal of Occupational and Environmental Medicine,* 2000c, 6 (2-3), 161-167.
53. **Ghilezan N.** - *Oncologie generală*, Editura Medicală, Bucureşti, 1992.
54. **Graffi A., Bielka H.** - *Probleme der experimentellen Krebsforschung*, Akademische Verlagsgesellschaft, Geest und Portig, Leipzig, 1959
55. **Griffiths J.F., Miller J.H., Suzuki D.T., Levontin C.R., Gelbart W.M.** – *An Introduction in Genetic Analysis*. 5th ed., Freeman Comp., New York, 1993.
56. **Griffiths A.J.F., Gelbart W.M., Miller J.H., Lewontin R.C.** - *Modern Genetic Analysis,* W.H. Freeman and Comp., New York, 2000
57. **Grobstein C.** – The Recombinant DNA Debate. *Scientific American*, 1977, 22, 237.
58. **Grunberger D., Weinstein I.B.** - Biochemical Effects of the Modification of Nucleic Acids by Certain Polycyclic Aromatic Carcinogens, pp.105-149, in "*Progress in nucleic acids research and molecular biology*" (Cohn W.E., Editor), Academic Press, New York, 1979.
59. **Grosveld F., Kollias G.** (Editors) – *Transgenic Animals*, Acad. Press, New York, 1992.
60. **Hayflick L.** - Cytogerontology, pp. 43-50, in "*Theoretical aspects of aging*" (Rockstein M., Editor), Academic Press, New York, 1974.
61. **Haiduc I., Zuckermann J.J.** - *Basic Organometallic Chemistry*, Walter de Gruyter, Berlin, 1985.

62. **Haley-Zitlin V., Richardson A.** - Effect of dietary restriction on DNA reppair and DNA damage, *Mutat. Res.*, 1994, 295, 237-245.
63. **Holmes G.E., Bernstein C., Bernstein H.** - Oxidative and other DNA damage as the basis of aging: a review, *Mutat. Res.*, 1992, 275, 305-315.
64. **Hrushesky W.J.M.** - Selected aspects of cisplatin nephrotoxicity in the rat and man. *Devel.Oncol.*, 1984, 17, 165-186.
65. **Ionescu Al.** - *Efectele biologice ale poluării mediului*, Editura Academiei R.S.R., Bucureşti, 1973.
66. **Israil Anca-Michaela** - *Biologie moleculară: prezent şi perspective*, Editura Humanitas, Bucureşti, 2000.
67. **Jacobsen B.J., Bowen K.L., Shelby E.A., Diener U.L., Kempainen .B.W.** - *Mycotoxins and mycotoxicoses*, Alabama A&M and Auburn Universities, 1993, Circular ANR-767, 1-11.
68. **Johnsson A., Olsson C., Anderson R., Cavallin-Stahl E.** - Evaluation of a method for quantitative immunohistochemical analysis of cisplatin-DNA adducts in tissues from nude mice, *Cytometry*, 1994, 17(2), 142-150.
69. **Johnsson A., Olsson C., Nygren O., Nilsson M., Seiving B., Cavallin-Stahl E.** - Pharmacokinetics and tissue distribution of cisplatin in nude mice: platinum levels and cisplatin-DNA adducts, *Cancer Chemother. Pharmacol.*, 1995, 37(1-2), 23-31.
70. **Jurcoane Ştefana** - Biotehnologii: Fundamente, Bioreactoare, Enzime, Editura Tehnică, Bucureşti, 2000.
71. **Kaplan J.C., Delpech M.** – *Biologie moléculare et médicine*. Flammarion, Paris, 1990.
72. **Katsumata K., Hayakawa N., Tanaka M., Sugiyama S., Ozawa T.** - Fragmentation of human heart mitochondrial DNA associated with premature aging, *Biochem. Biophys, Res., Commun.*, 1994, 202, 102-110.
73. **Kazantzis G., Lorna J. Lilly** – Mutagenic and carcinogenic effects of metals, Chap.14, pp.1-36, in "*Handbook on the toxicology of metals*" (Frieberg L. et al., Editors), Elsevier, North- Holland Biomedical Press, 1979.
74. **Kendrew J.** (Editor) - *The Encyclopedia of Molecular Biology*, Blackwell Science Ltd., Oxford-London-Edinburgh, 1994
75. **Koldziejczyk P.P.** - Chemists in the New World of Biotechnology, *Canadian Chemical News*, 1998, 16
76. **Konopka R.J., Benzer S.** - Clock mutants of Drosophila melanogaster, *Proc.Nat.Acad.Sci.*, 1971, 68(9), 2112-2116.
77. **Lawley P., Brooks P.** - Interstrand crosslinking of DNA by difunctional alkylating agents, *J. Mol. Biol.*, 1967, 25, 143-151.
78. **Lemmer B.** (Editor) - *Chronopharmacology: Cellular and biochemical interactions*, Marcel Dekker, Inc., New York-Basel, 1989.

79. **Lemoine N.R., Wright N.A.** (Editors) – *The molecular pathology of cancer*. Vol.16, Cold Spring Harbor Press, Plainview, 1993.
80. **Lindemann H., Harbers E.** - In vitro - Reaktion der drei alkylierenden Pharmaka Cyclophosphamid, Ifosfamid und Trofosfamid mit DNS und DNS Bausteinen, *Drug. Res.*, 1980, 30, 12, 2075-2080
81. **Lippert B.** (Editor) - *Cisplatin - Chemistry and Biochemistry of a Leading Anticancer Drug*, Verlag Helvetica Chimica Acta Zurich, Wiley VCH, Weinheim-New York-Chichester-Brisbane-Singapore-Toronto, 1999.
82. **Littlefield N.A., Hass B.S., James S.J., Poirier L.A.** - Protective effect of magnesium on DNA strand breaks induced by nickel or cadmium. *Cell Biol. Toxicol.*, 1993, 10 (2), 127-135.
83. **Macrae R., Robinson R.K., Sadler M.J.** - *Encyclopedia of Food Science and Nutrition*, Academic Press, London, 1992.
84. **Malling H.V., Wassom J.S.** - Action of mutagenic agents, pp.99-152, in "*Handbook of Terato logy*", Vol.I (Wilson J.G., Fraser F.C., Editors.), Plenum Publishing Corporation, New York, 1977.
85. **Maniatis T., Fritsch E.F., Sambrook J.** – *Molecular Cloning. (A Laboratory manual)*, Cold Spring Harbor Laboratory Publ., Cold Spring Harbor - New York, 1982.
86. **Marzilli L.G.** – Metal-ion interactions with nucleic acids and nucleic acids derivatives, pp. 255-378, in "*Progress in inorganic chemistry*", Vol.23 (Lippard S.J., Editor), J.Wiley and Sons Inc., New York, 1977.
87. **Maximilian C., Ioan Doina Maria** – *Dicţionar enciclopedic de genetică.* Editura Stiinţifică şi Enciclopedică, Bucureşti, 1984.
88. **von Mayersbach H.** – *Nova Acta Leopoldina*, 1977, 46, 115.
89. **McIntyre A.D., Mills C.F.** (Editors.) – *Ecological toxicology research*, Plenum Publishing Corporation, New York, 1977.
90. **McKusick V.A.** – *Mendelian Inheritance in Man. Catalogs of Autosomal Dominant, Autosomal Recessive, and X-linked Phenotypes.* 8th ed. The Johns Hopkins University Press, Baltimore - London, 1980.
91. **Medvedev Z.A.** - An attempt at a rational classification of theories of aging, *Biol. Rev.*, 1990, 65, 375-398.
92. **Mead A.D., Pey K.N., Herrnstadt C., Marcil A.R., Smith M.L.** – An universal method for the disect cloning of PCR amplified nucleic acid, *Bio/Technology*, 1991, 9, 657-663.
93. **Micklos D.A., Freyer G.A.** – *DNA Science - A Fist Course in Recombinant Technology.* Printed by Carolina Biological Supply Company, Burlington, 1990.
94. **Moll M., Moll Nicole** – *Additifs alimentaires et auxiliaires technologiques*, Dunod, Paris, 1998.
95. **Morgans L.F., Burns E.R.** - Effect of cyclophosphamide on circadian rhythms in mitosis and DNA synthesis in normal mice and mice bearing the Ehrlich ascites carcinoma, *Oncology*, 1984, 41, 135-139.

96. **Nagata C., Kodam M., Kimura T., Aida M.** - Metabolically generated free radicals from many types of chemical carcinogens and binding of radicals with nucleic acid bases, pp. 43-54, in "*Carcinogenesis: Fundamental mechanisms and environmental effects*" (Pullman B., Ts'o P.O.P., Gelboin H., Editors), D. Reidel Publishing Company, Dordrecht-Holland, 1980.

97. **Neidle S., Waring M.** (Editors) – *Molecular aspects of anticancer drug - DNA interactions.* Vol. I, CRC Press, Boca Raton, 1993.

98. **O'Dwyer P.J., Johnson S.W., Hamilton T.C.** - Cisplatin and its analogues, pp.418-432, in *"Cancer. Principles and Practice of Oncology"*, 5th ed. (de Vita V.T. Jr., Hellman S., Rosenberg S.A., Eds.), Lippincott-Raven Publishers, Philadelphia-New York, 1997

99. **Pană I., Gârban Z., Mihalca Victoria, Brazdă Maria, Sayti L.** - Aspecte comparative privind acțiunea radiațiilor X și a ciclofosfamidei., *Radiologia*, 1983, XXI, 4, 285-296.

100. **Pasternak R. F., Gibbs E. J.** - Probing of Nucleic Acids by Metal Ion Complexes of Small Molecules, pp. 367-397, in *"Metal Ions in Biological Systems"*, Vol. 33, (Sigel H., Editor), Marcel Dekker, New York, 1996

101. **Popa L., Repanovici Rodica** – *Tehnologia DNA recombinant*. Editura Științifică și Enciclopedică, București, 1982.

102. **Popescu L.M., Ursaciuc C., Bancu A., Cialacu V.** - *Imunologie medicală*, Editura Universitară "Carol Davila" București, 1998.

103. **Pullman B.** - Electronic aspects of the interactions between the carcinogens and possible cellular sites of their activity, p.91, în "*Symposium on molecular action of mutagenic and carcinogenic agents*", 6-9 April, Oak Ridge, Tennessee, U.S.A., 1964.

104. **Radu G.L.** (Editor) - *Tendințe actuale în biotehnologie*, Editura Ilex, București, 2001.

105. **Reinberg A., Halberg F.** - *Chronopharmacology*, Pergamon Press, New York - Paris, 1978.

106. **Reinberg A., Smolensky M.H.** - Circadian changes of drug disposition in man, *Clin.Pharmacokin.*, 1982, 7, 401-420.

107. **Rogers H.G., Parkers H.C.** - Trangenic plants and the environment, *J. of Exp. Bot.*, 1995, 286, 467-488.

108. **Rosenberg B., Van Camp L., Krigas T.** - Inhibition of cell division in Escherichia coli by electrolysis products from a platinum electrode, *Nature*, 1965, 205, 698.

109. **Salmon S.E., Apple M.** – Chemotherapeutic Agents, in *"Review of medical Pharmacology"*, 5th ed. (Meyers F.H., Jawetz E., Goldfien A., Editors), Lange Med Publ., 1976.

110. **Sarma D.S.R., Fajalkshmi S., Farber E.** - Chemical carcinogenesis: Interaction of carcinogens with nucleic acids, pp.235-288, in "*Cancer - A comprehensive treatise etiology: Chemical and physical carcinogenesis*" (Becker F.F., Editor), Plenum Press, New York, 1975.

111. **Seamus J. M.** - *Apoptosis and Cancer*, S. Karger, A.G.Basel, 1997
112. **Segal B., Cotrău M., Segal R.** - *Factori de protecţie prezenţi în produsele alimentare*, Editura Junimea, Iaşi, 1987.
113. **von Sengbusch P.** – *Molekular und Zellbiologie.* Springer Verlag, Berlin-Heidelberg-New York, 1979.
114. **Sissoeff I., Grisvard J., Guillé E.** – Studies on metal ions-DNA interactions: behaviour of reiterative DNA sequences, pp.165-199, in "*Progr. Biophys. Molec. Biol.*", Vol.31, Pergamon Press, London, 1976.
115. **Smaaland R., Laerum O.D., Lote K.** - DNA synthesis in human bone marrow is circadian stage dependent, *Blood*, 1991, 77 (12), 2603-2611.
116. **Souverrain R.** – *Les additifs autorisés dans les produits alimentaires*, 3- ème edition, Imprimerie Edimpra, Paris, 1986.
117. **Srivastava P.S.** (Editor) - *Plant Tissue Culture and Molecular Biology: Application and Prospects*, Narosoa Publishing House, New Delhi, 1998.
118. **Şerban M.** - Enzime, pp.207-281, în "*Biochimie medicală veterinară*" (Tămaş V., Şerban M., Cotruţ Maria, Editori), Editura Didactică şi Pedagogiă, Bucureşti, 1981.
119. **Şerban M., Roşoiu Natalia** - *Substanţe biologic active din organisme marine*, Editura Academiei Române, Bucureşti, 1992.
120. **Şteflea D.** (Editor) - *Cronobiologia şi medicina*, Vol.I-II, Editura Medicală, Bucureşti, 1986.
121. **Teicher B.A.** - Antitumor alkylating Agents, pp. 405-418, in "*Cancer. Principles and Practice of Oncology*", 5th ed. (de Vita V.T. Jr., Hellman S., Rosenberg S.A., Eds.), Lippincott-Raven Publishers, Philadelphia-New York, 1997
122. **Tiollais P.A., Rambach A.** – Genie genetique ou manipulations genetiques? , *La recherche*, 1977, 82 (8), 821-832.
123. **Walker J.M.** - Detection and estimation of peptides, pp.29-44, in "*Analysis of Amino Acids, Proteins and Nucleic Acids*" - Biotechnology by open learning (James W., Editor), Butterworth-Heinemann Ltd., Oxford-London-Boston- Munich-New Delphi-Singapore-Sydney-Tokyo-Toronto, 1992.
124. **Waring M.J.** - DNA modification and cancer, *Ann. Rev. Biochem.*, 1981, 50, 159-192.
125. **Wassom J.S.** - *Mutagenesis, carcinogenesis and teratogenesis information system*, Ed. by Information Center Complex, Oak Ridge, 1980.
126. **Wilson K., Walker J.M.** (Editors) – *Principles and techniques of practical biochemistry*. 4th ed., Cambridge University Press, 1994.
127. **Wogan G.N.** - Aflatoxin as a human carcinogen, *Hepatology*, 1999, 30 (2), 573-755.
128. **Wu R.** – DNA sequence analysis. *Annu. Rev. Biochem.*, 1978, 47, 607.
129. **Teodorescu-Exarcu I.** (Editor) - *Fiziologia şi fiziopatologia sistemului nervos*, Editura Medicală, Bucureşti, 1978.
130. **Zamfir G.** - *Efectele unor poluanţi şi prevenirea lor*, Editura Academiei R.S.R., Bucureşti, 1979.

131. **Zarnea G., Mencinicopschi G., Brăgarea S.** – *Bioingineria preparatelor enzimatice microbiene*, Editura Tehnică, Bucureşti, 1980.
132. **Zarnea G.** – *Tratat de Microbiologie generală.*, Vol. I. *Virologie generală. Anatomie bacteriană,* Editura Academiei R.S. România, Bucureşti, 1983.
133. * * * - Rapport O.M.S., Nr.406 – *Recherches sur la pollution du milieu*, Geneva, 1968.
134. * * * - *Monographs on the evaluation of carcinogenic risk of chemicals to man*, Vol.3, Publ. by I.A.R.C., Lyons, 1975.
135. * * * - *Evaluation de certains additifs alimentaires et contaminants*. 37-čme Rapport du Comité mixte FAO / OMS / Serie de Rapports techniques d'experts des additifs alimentaires No. 806, OMS Geneve, 1991.
136. *** - *Farmacopeea Română*, Ed. X-a, Ed. Medicală, Bucureşti, 1998.
137. *** - *Enzyme Nomenclature* - Recommandations (1978) of the Nomenclature Committee of the International Union of Biochemistry, Publ. for I.U.B by Academic Press Inc. , New York-San Francisco-London, 1979.
138. *** - http://www.ucsusa.org/food_and_environment/biotechnology/page.cfm

BCU IASI/CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

BCU IASI/CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

ADDENDA

Tabel I. Unităţi de bază din Sistemul Internaţional (SI)

Specificare	Unitatea	Simbol
Cantitatea de substanţă	mol	mol sau M
Curent electric (I)	amper	A
Lungime (l)	metru	m
Intensitatea luminoasă	candela	cd
Masa (m)	kilogram	kg
Temperatura (T)	Kelvin	K
Timp (t)	secunda	s

Tabel II. Principalele unităţi derivate din SI

Specificare	Unitatea	Simbol	Echivalent în unităţi SI
Sarcina electrică, cantitatea de electricitate	coulomb	C	$1\ C = 1\ A \cdot s = 1\ J \cdot V^{-1}$
Potenţialul electric, diferenţa de potenţial	volt	V	$1\ V = 1\ J \cdot A^{-1} \cdot s^{-1} = W \cdot A^{-1}$
Rezistenţa electrică	Ohm	Ω	$1\ \Omega = m^2 \cdot kg \cdot s^{-3} \cdot A^{-2}$
Energia, lucrul mecanic, cantitatea de căldură	joule	J	$1\ J = 1\ W \cdot s = 1\ kg \cdot m^2 \cdot s^{-2}$
Energia	electron volt	eV	$1\ eV = 1{,}602 \cdot 10^{-19}\ J$
Forţa	newton	N	$1\ N = 1\ kg \cdot m \cdot s^{-2}$
Frecvenţa	hertz	Hz	$1\ Hz = s^{-1}$
Fluxul luminos	lumen	lm	$1\ lm = 1\ cd \cdot sr^{-1}$ (sr = steradian)
Iluminarea	lux	lx	$1\ lx = 1\ lm \cdot m^{-2}$
Puterea, fluxul radiant	watt	W	$1\ W = 1\ kg \cdot m^2 \cdot s^{-3}$
Presiunea	pascal	Pa	$1\ Pa = 1\ N \cdot m^{-2} = 1\ kg \cdot m\text{-}1 \cdot s^{-2}$
Dezintegrările radioactive	Bequerel	Bq	$1\ Bq = 1\ s^{-1}$

BCU "ASICENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Tabel III. Unităţi de măsură utilizate în biochimie şi biologia moleculară

Specificare	Mărimea sau unitatea	Simbol	Echivalent
Concentraţia	molaritate	M	mol . L^{-1} sau mol . dm^{-3}
	molalitate	m	mol . kg
	normalitate	N	mEq . L^{-1}
Osmolaritatea		Osm	Osm . kg^{-1}
Masa (m)	gram	g	1 g = 10^{-3} kg
Masa (greutate moleculară)	gram per mol	g/mol	10^{-3} kg . mol^{-1}
Masa particulei	dalton	Da	1 Da = 1,6605 . 10^{-27} kg
Presiunea (P)	bar	bar	1 bar = 10^{5} Pa
Temperatura (T°)	grade celsius	°C	0°C = 273,15 K
Timp (t)	minute	min	1 min = 60 s
	ore	h	1 h = 3.600 s
	zile	d	1 d = 24 . 3.600 s
Volum de lichid (V)	litru	l sau L	1 l = 10^{-3} m^3
Activitatea catalitică (în reacţiile enzimatice)		kat	1 kat = mol . s^{-1}
Constanta de sedimentare	svedberg	S	1 S = 10^{-3} s

Tabel IV. Prefixarea unităţilor de măsură (multiplii şi submultipli)

Denumire	Simbol	Mărimea (raportată la unitate)	Denumire	Simbol	Mărimea (raportată la unitate)
tera-	T	10^{12}	deci-	d	10^{-1}
giga-	G	10^{9}	centi-	c	10^{-2}
mega-	M	10^{6}	mili-	m	10^{-3}
kilo-	K	10^{3}	micro-	μ	10^{-6}
hecto-	h	10^{2}	nano-	n	10^{-9}
deca-	da	10^{1}	pico-	p	10^{-12}
unitatea de măsură	-	10^{0}	femto-	f	10^{-15}

BCU IAŞI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Tabel V. Constante fizico- chimice fundamentale

Specificare	Simbol	Formulare
Numărul Avogadro	N	$N = 6{,}022 \cdot 10^{23}$ mol
Constanta Planck	h	$h = 6{,}626 \cdot 10^{-34}$ J · s
Constanta Faraday	F	$F = e \cdot N = 9{,}649 \cdot 10^{4}$ C · mol
Constanta Boltzman	k	$K = R \cdot N = 1{,}381 \cdot 10^{-23}$ J · K^{-1}
Constanta gazelor	R	$R = k \cdot N = 8{,}314$ J · mol^{-1} · K^{-1}
Sarcina particulei elementare	e	$e = F \cdot N^{-1} = 1{,}602 \cdot 10^{-19}$ · C
Accelerația gravitațională (la nivelul mării și la 45° latitudine)	g	$g = 9{,}806$ m · s^{-2}
Viteza luminii	c	$c = 2{,}998 \cdot 10^{8}$ m · s^{-1}

Tabel VI. Factori de conversie ai unor unități uzuale

Unitatea	Simbol	Conversie (în unități SI)
Angström	Ä	1 Ä = 10^{-1} nm = 10^{-10} m
Atmosfera	at	1 at = 760 mmHg = $1{,}013 \cdot 10^{5}$ Pa = 1,013 bar
Calorie	cal	1 cal = 4,1868 J
Curie	Ci	1 Ci = $3{,}77 \cdot 10^{10}$ Bq
Einstein	E	1 E = 1 mol fotoni
Erg	erg	1 erg = 10^{-7} J
Rad	rd	1 rd = 0,01 J · kg^{-1}
Roentgen	R, r	1 R = $2{,}58 \cdot 10^{-4}$ C · kg^{-1}
Torr	torr	1 torr = 101,125 / 760 Pa

Tabel VII. Alfabetul grecesc

A α	alfa	I ι	iota	Π ρ	ro
B β	beta	K κ	kappa	Σ σ	sigma
Γ γ	gamma	Δ λ	lambda	T τ	tau
Δ δ	delta	M μ	miu	Y υ	Îpsilon
E ε	epsilon	N ν	niu	Φ φ	phi
Z ζ	dzeta	Ξ ξ	csi	X χ	hi
H ε	eta	O o	omicron	Ψ ψ	psi
Θ τ	theta	Π π	pi	Ω ω	omega

Tabel VIII. Enzime de restricție (ER) – prezentare generală (date compilate din literatura de specialitate)

Enzima de restricție (denumirea)	Surse pentru obținere (microorganisme)	ER eficiență în RFLP	Secvența (de recunoaștere)	Numărul situsurilor de clivare (excizie) pentru virusuri		
				□ X 174	□	SV40
Eco RI	Escherichia coli RY 13	+	G AATTC	0	5	1
Eco RII	Escherichia coli R245		CC GG	2	> 35	16
Hin 1056	Hemophilus influenzae 1056		CGCG	14	>50	0
Hind III	Hemophilus influezae	+	A AGCTT	0	6	6
Hind II	Hemophilus influenzae Rd	+	GTPy PuAc	13	34	7
Hinf I	Hemophilus influenzae Rf		G ANTC	21	>50	10
Hae II	Haemophilicus aegipticus		PuGCGC Py	8	>30	1
Bam HI	Bacillus amyloliquefaciens H	+	G GATCC	0	5	1
Bam FI	Bacillus amyloliquefaciens F		GGATCC	0	5	1
Taq I	Thermus aquaticus YT I	+	T CGA	10	>50	1
Kpn I	Klebsiella pneumoniae		GGTAC C	0	2	1
Atu CI	Agrobacterium tumefaciens C58	+	TGATCA	0	7	1
Pvu I	Proteus vulgaris		CGAT CG	0	3	0
Sau 3A	Staphilococcus aureus 3A		GATC	0	>50	8
Sal I	Streptomices albus G		G TCGAC	0	2	0
Bgl	Bacillus globigii		A GATCT	0	22	1
Xor	Xanthomonas orzyae		CTGCAG	1	18	2

Tabel IX. Aplicații ale biologiei moleculare la studiul autosomilor în relația cromosom-genă-manifestare patobiochimică (date exemplificative după " Catalogul bolilor ereditare sistematizate" McKusick)

Nr. crt.	Autosomi		Gena afectată fragment DNA codat pentru	Simbol	Manifestare patobiochimică (aspect clinic)	Codificarea după "Catalogul bolilor ereditare"
	Număr	Localizare				
1	1	p34	uroporfirinogen-decarboxilază	UROD	Porfirie cutanată tardivă	McK-17 610
2	1	p22	TSH-catena beta	TSHB	Hipotiroidism prin deficit de hormon tireostimulent (TSH)	McK-18 854
3	2	p24	apo-lipoproteina B	APOB	Hipo-□-lipoproteinemie	McK-10 773
4	3	q21	transferine	TF	Atransferinemie	Mck-19 000
5	4	q21-q13	albumine	ALB	Analbulinemie	McK-10 360
6	5	q11-q13	receptor de glucocorticoizi	GRL	Rezistența la cortizol	McK-23 157
7	6	q21,3	citocrom P 450 ; steroid-21-hidroxilaza	CYP21B	Hiperplazie congenitală a suprarenalelor prin deficit în 21-hidroxilază	McK-20 191
8	6	q23	arginază	ARG1	Argininemie	McK-27 780
9	7	q22-ter	tripsina 1	TRY1	Deficit de tripsinogen	McK-27 600
10	7	q22-q23	2,3-difosfogliceromutază	BPGM	Deficit de 2,3-difosfogliceromutază	McK-22 280
11	7	q22,3-q23,1		CF	Mucoviscidoza	McK-21 970
12	8	q13-q22	anhidraza carbonilică II	CA2	Acidoza renală cu osteoporotă	McK—11 481
13	9	q22	aldolaza B	ALDOB	Intoleranța la fructoză	McK-22 960
14	10		orntin-aminotransferază	OAT	Hiper-ornitinemie	McK-25 887
15	11	P15,5	insulina	INS	Diabetul indus de insulina normală	Mck-17 673
16	11	p15	parathormon	PTH	Hipoparatiroidie familială	McK-16 845
17	11	p13	catalaza	CAT	Acatalazemie	McK-11 550
18	12	q24,1	fenilalanin-hidroxilaza	PAH	Fenilcetonurie	Mck-26 160
19	13	q34	factor x de coagulare	F 10	Deficit de factor X	McK-22 760
20	14	q13,1	purin nucleozid-fosforilaza	NP	Deficit de purin nucleozid fosforilază	McK-16 405
21	15		citocrom P 450 colesterol 22-22desmolaza	CYP 11A	Hiperplazia congenitală a suprarenalelor prin lipoidoză (de tip I)	Mck-20 171
22	16	q13	familia genelor pentru globina de tip □	HBA	Hemoglobinopatiile și talasemia (cu afectarea catenei alfa)	Mck-14 180
23	16	q22-q24	tirosin-aminotransferaza	TAT	Tirosinemia	McK-27 660
24	17	q22-q24	hormon somatotrop, i.e.: hormon de creștere (engl. growth hormone)	GH	Nanismul hipofizar prin deficit de hormon somatotrop	McK-13 925
25	18	q11-q12	prealbumina	PALB	Polinevrita albuminoidă	McK-17 630
26	19	q13	receptor de LDL	LDLR	Hipercolesterolemie familială	McK-147 389
27	20	q13-qter	adenozin dezaminaza	ADA	Deficit de adenozin dezaminază	McK-10 270
28	21	q22	cistationin beta-sintetaza	CBS	Homocistinurie	Mck-23 620

Tabel X. Aspecte de biologie moleculară specifice gonosomilor în relaţia cromosom–genă –manifestare patobiochimică (date exemplificative după "catalogul bolilor ereditare" sistematizat de McKusick)

Nr. Crt.	Genosomi		Gena afectată Segment genic codant pentru	Simbol	Manifestare patobiochimică (aspect clinic)	Codificare după "Catalogul bolilor ereditare"
	Tipul	Localizarea				
1	X	q21,2	distrofină	DMD	Miopatie Duchenne	McK-31 020
2	X	q21,1	citocrom b-245 cu catena b	CYBB	Granulomatoză cronică	McK-30 640
3	X	qcen-q13	receptor de androgeni	AR	Testicul feminizat	McK-31 370
4	X	q28	factor antihemofilic VIII	F8C	Hemofilia A	Mck-30 670
5	X	q27,1-q27,2	Factor antihemofilic IX	F9	Hemofilia B	McK-30 690
6	X	q28	Glucozo–6-fosfat dehidrogenază	G6PDH	Deficit de glucozo –6 –fosfat dehidrogenază	McK-30 590
7	X	p11	factor determinant pentru testicol	TDF	Disgenezia gonadică masculinizantă XX	Mck-31 497
8	X	p11,2	factori determinanti pentru sex	SDF	Afecţiuni legate de sex: bărbat XX; femeie XY	McK-27 885

GLOSAR MINIMAL

Alela, pl. alele (gr. alleon – un altul) – versiune alternativă a aceleeaşi gene vâcare diferă prin secvenţa nucleotidelor (i.e. a nucleozidmonofosfaţilor NMP) constituenţi. În natură se disting obişnuit "sisteme dialele" şi uneori "sisteme multi-alele". În "sistemele multi-alele" cunoscute şi sub denumirea de "alelomorfism multiplu" există trei sau mai multe gene alternative pentru acelaşi locus. Noţiunea de "alelă" este sinonimă cu aceea de "alelomorfă" (gr. allelon-un altul, o alta, morphe-formă) – definită în tratatele mai vechi – ca o genă alternativă sau o serie de gene alternative, care pot ocupa acelaşi "locus genic" şi care controlează expresii diferite ale aceluiaţi caracter. Noţiunea de alele – prin extensiune- desemnează şi variantele de DNA non-codant dispuse în acelaşi locus, i.e. polimorfism anonim.

Ambre – mutaţie care crează un codon nonsens UAG într-o secvenţă codantă a unei gene. Aceasta este un codon notat prin STOP sau TER (terminal), pentru considerentul că poate întrerupe traducerea mesajului informaţional (v. de asemenea Ochre şi Opal).

Amniocite – celule de origine fetală prezente în lichidul amnionic. Prelevarea acestora se face prin puncţia amniosului numită "amniocenteză", după care se procedează la investigaţiile de biologie moleculară, importante pentru eredobiologie şi/sau eredopatologie.

Amprenta DNA (eng. DNA fingerprint; fr. empreinte génétique) – expresie unică a fragmentelor de DNA decelate printr-o variantă a metodei de eva-luare a lungimii fragmentului de restricţie (RFLP) bazată, de aseme-nea, pe metoda Southern. Estimarea amprentei DNA este uzitată în medicina legală (criminalistică, victime ale calamităţilor naturale etc.), chimia judiciară (testul paternităţii, imigraţiile etc.).

Aneuploidie (gr. a-fără; eu-bine; haploos-o dată; eidos-formă, aspect) – sau heteroploidie (gr. heteros-diferit) – prezenţa unui număr anormal de cromosomi, constând în apariţia de cromosomi suplimentari – e.g. în trisomie, sau dispariţia unor cromosomi – e.g. monosomie. Aneuploid (heteroploid) – organism caracterizat prin prezenţa unui număr excedentar sau deficitar de cromosomi.

Anticodon - triplet trinucleotidic (constituit din trei resturi de ribonucleozidmonofosfat-rNMP) prezent în RNA de transfer (tRNA). În cursul transmiterii mesajului informaţional se produce hibridizarea tripletelor complementare: codon din mRNA şI anticodon din tRNA.

Antiparalelism - mod de orientare inversă a catenelor (lanţurilor) complementare din molecula de DNA. În această manieră

extremitatea 3 a unei catene se dispune în proximitatea extremității 5 a altei catene.

Archeobacterii - organisme procariote care pot supraviețui în condiții extreme de temperatură și/sau de salinitate. Archeobacteriile sunt considerate ca organisme primordiale (în evoluție). Este remarcabilă, de asemenea, prezența intronilor în genele acestora.

Bacteriofagii sau **fagii** (gr. bakterion - bastonaș; phagein - a mânca) - virusuri care pot infecta bacteriile. Bacterio-fagii pătrund și se multiplică în celulele bacteriene. Structural - fagii sunt formați în principal, din acid nucleic (DNA sau RNA) și proteine. Morfologic - la un bacteriofag se disting: a) capul - constituit din core ("miez" sau "zonă centrală") protejat de un înveliș specific; b) coada - care reprezintă o teacă externă (contractilă) formată din subunități proteice identice, un ax cilindric cu cavitate centrală. Activitatea biologică - la fagi este condiționată de tipul acestora: 1) fagii temperați - se integrează ciclului lizogenic; 2) fagii virulenți - produc un ciclu litic.

Bacteriofagi de tip Charon (denumire care apelează la numele unui personaj din mitologie - este constituit dintr-o secvență de deoxiribonucleotide prezente în DNA bacteriofagal. La bacteriofagul λ - care se dezvoltă în organismul bacteriei Escherichia coli - s-a constatat că există o replicație autonomă a DNA bacteriofagal (din nucleoidul procariotic) în raport cu DNA plasmidal (din plasmidele eucariotice). Acest fapt face posibilă "atașarea" unor fragmente de DNA bacteriofagal la fragmente de DNA cromosomal. De la aceste observații s-a ajuns la obținerea unor "bacteriofagi de tip Charon", care se pretează utilizării în tehnologia DNA recombinant.

Biobalistica - este o metodă mecanică în care se folosește "sistemul proiectil" prin care fâșii de metal acoperite cu material genetic (fragmente moleculare de DNA) sunt proiectate în interiorul celulelor. Fâșiile trec printr-o placă de metal perforată și ajung în celulă unde materialul genetic luat în studiu trece spre nucleu fiind încorporat printre genele celulei-gazdă (numită uneori celulă-recipient)

Biohazard (gr. bios - viață; engl. hasard - pericol, risc) - pericol generat de organismele (îndeosebi bacterii și virusuri) modificate prin procedee specifice ingineriei genetice. Biotransformările produse pot genera "forme" deosebit de virulente în raport cu așa numita "formă sălbatică" care reprezintă "forma originală" (i.e. organismul nesupus transformărilor). Astfel, spre exemplu, un pericol major poate reprezenta scăparea din laboratoarele de specialitate a virusurilor oncogene, a bacteriilor cu plasmide transformate prin tehnici de inginerie genetică. În astfel de situații se pot declanșa endemii sau chiar epidemii.

Capsida sau **capsula virală** - învelișul proteinic al genomului viral.

CentiMorgan (cM) - distanța genică dintre doi loci dintr-un cromosom între care frecvența crossing-overului este de 1%. Aceasta corespunde, la om, cu distanța de aproximativ 10^6 pb (i.e. 1 Mb).

Chemoporația - metodă chimică prin care se crează "pori" (orificii transmembranare)

în vederea translocării unui fragment de DNA (fragment genic). După chemoporație fragmentul de DNA traversează membrana celulară și intră în interacție cu DNA din celulă. Pentru chemoporație se utili-zează soluții speciale conform proto-colului experimental al tehnologiei inițiate. În biologia moleculară se utilizează, în funcție de domeniul experimental abordat și *metoda electroporației.*

Clonă (gr. klon - ramură) - totalitatea descendenților vare prezintă uniformitate genetică prin faptul că se obțin prin reproducere asexuată. Indivizii rezultați prin clonare având un unic ascendent (e.g. o "celulă primară") vor păstra caracteristicile genomice atâta timp cât nu intervin factori mutageni.

Clonaj celular - procedeu de izolare a unei celule și a descendenței acesteia pentru a forma o linie celulară. Astfel se crează o linie celulară care are o singură sursă.

Clonaj molecular - procedeu de izolare și recombinare in vitro a unei gene. Prin extensiune, noțiunea de clonaj molecular definește recombinarea unui fragment de DNA codant sau non-codant cu un vector și replicația autonomă a produsului nou format (DNA recombinant) în interiorul unei celule gazdă. Cultura acestei celule conținând vectorul recombinant și DNA inițial (inserat pe vector), poate per-mite obținerea de DNA inițial în stare pură și în cantități (teoretic) nelimitate. Clonajul molecular a fost utilizat în perfectarea metodelor specifice biologiei moleculare.

Codon - triplet trinucleotidic (format din trei resturi de ribonucleozidmonofosfat - rNMP) prezent în RNA mesager (mRNA). Există 64 și reprezintă triplete trinucleotidice care conțin trei nucleobaze (din totalul de 4 nucleobaze specifice: C, U, A, G). Din totalul de 64 codoni combinații posibile, din aceștia: 61 codoni semnificativi - care codifică 20 de amino acizi precursori ai catenelor poli-peptidice și 3 codoni nonsens - de tip STOP sau TER - (codonii UAA - Ochre, UAG - Amber și UGA - Opal), care nu codifică nici un amino acid, semnificând întreruperea traducerii mesajului informațional. În numeroase cazuri codonii semnificativi pot corespunde unuia și aceluiași aminoacid - fenomen cunoscut sub numele de "descrescența codului genetic".

Complementaritate - mod de dispunere specific nucleobazelor din catenele vicinale antiparalele ale acizilor nucleici. Complementaritatea rezidă în formarea legăturilor de hidrogen între perechile de nucleobaze (baze): A-T și A-U, respectiv C-G. Acest mod de legare constituie o regulă generală definitorie pentru structura secundară a acizilor nucleici.

Cosmide - (engl. cohesive - coezive; site - poziție, loc) - sunt artefacte constituite din secvențe de deoxiribonucleotide care conțin fragmente de DNA plasmidal și DNA bacteriofagal (din bacteriofagul λ), structurate in vitro prin "legarea" zonelor coezive terminale. Grație structurii de artefact, cosmidele fac posibil clonajul unor fragmente de DNA mai mari, ajungând până la 45 kb. Cosmidele se utili-zează ca vectori în tehnologia DNA recombinant.

Cristalografie cu raze X - metodă fizico-chimică bazată pe difracția razelor X (razele Roentgen) la trecerea aces-tora prin cristalele pure ale unor substanțe.

Utilizarea acestei metode se pretează studiului structurii atomice a substanţelor. Metoda a fost aplicată cu succes în studiul structurii unor substanţe de interes biologic, e.g.: acizi nucleici (datele obţinute cu ajutorul acestei metode au facilitat descoperirea structurii secundare a DNA); enzime etc.

Crossing-over - interschimb (schimb reciproc) de nucleozidmonofosfaţi între acizii nucleici din cromosomii homologi. Acest schimb se produce în general în momentul meiozei la nivelul chiasmelor. Mecanismul descris este responsabil de recombinările genetice.

Dalton (Da) - unitate de măsură utilizată pentru exprimarea masei moleculare a substanţelor chimice. Un Dalton reprezintă masa moleculară a unui atom de hidrogen: $1,67 \cdot 10^{-24}$ grame.

Diploid (gr. diplos-dublu; eidos-formă. aspect) - număr de cromosomi caracteristici somatocitelor (celulelor din corp-soma), constând dintr-un set dublu de cromosomi. Se notează uzual prin "2n". Numărul diploid (2n) de cromosomi este adesea numit şi "număr zigotic" sau "număr somatic" de cromosomi şi este întâlnit în mitoză. Numărul diploid include două seturi de cromosomi somatici denumiţi autosomi şi doi cromosomi sexuali denumiţi gonosomi. Spre exemplu, la om există, în principiu, două seturi reprezentate de 44 autosomi şi 2 gonosomi (notaţi X, Y). Deci, numărul diploid este 46 cromosomi.

DNA cu dextrorotaţie - structura sterică a DNA dublu helix în care conformerii sunt torsionaţi în sens orar. Conformerii aparţinând acestor familii sau genuri de DNA sunt:A-DNA; B-DNA (specific stării native); C-DNA; D-DNA. Un fragment cu rotaţie completă (360°) prezintă 10 pb super-pozabile.

DNA cu senestrorotaţie - conformaţie specifică DNA dublu helix în care conformerii sunt torsionaţi în sens antiorar. Această structură sterică s-a decelat doar la DNA-Z. Un fragment este constituit din 6 pb superpozabile.

DN-aze sau **deoxiribonucleaze** - clase de enzime care asigură secvenţializarea prin "excizie" ("clivare") a catenelor de DNA.

DNA complementar (cDNA) - secvenţă de DNA complementară unui RNA mesager (mRNA), formată prin transcripţie inversă sub acţiunea unei reverstranscriptaze. Investigarea structurii secvenţei de cDNA a dus la constatarea că aceasta corespunde unei versiuni a genei debarasată de introni.

Electroporaţie - metodă fizică uzitată pentru translocarea unui fragment de DNA (fragment genic). În urma electroporaţiei fragmentul de DNA traversează membrana celulară, după care interacţionează cu DNA celular. Electroporaţia se practică îndeosebi la celulele vegetale şi rezidă în apli-carea unui curent electric pulsatil, de înalt voltaj, care produce deschiderea porilor membranei celulare prin care va trece DNA străin. În biologia moleculară în scopul translocării DNA se mai utilizează şi o metodă numită *"chemoporaţie"*

Endonucleaze - clasă de enzime care produc "clivarea" (i.e. "secţionarea" sau "excizia") legăturii fosfodiesterice între două nucleotide din interiorul catenei (cate-

nelor) de acid nucleic. Aceste enzime sunt specifice unui anumit tip de acid nucleic, e.g.: mc-RNA; mc-DNA (monocatenar); dc-DNA (dublu catenar).

Episom (gr. epi-în plus; soma-corp) de DNA întâlnită la procariote (bacterii) care poate exista sub o formă extragenoforială autonomă sau se poate insera în DNA genoforal. Se re-amintește faptul că s-a convenit a utiliza denumirea de "genofor" pentru procariote, rezervându-se aceea de cromosom - pentru eucariote. Prin extensiune, noțiunea de episom de-semnează - la modul general-formele de DNA extracromosomal, cu capacitate de autoreplicație.

Euploidia (gr. eu-bine; haploos-odată; eidos-formă, aspect) - prezența unui număr (set) complet de cromosomi în toate celulele organismului. Numărul normal de cromosomi este așa numitul "număr diploid" (v. diploid).

Exoni - secvențe de DNA codante sau non-codante, dispersate în molecula de DNA genic, care-și mențin efectul asupra RNA mesager. Exonii dispar după transcrierea primară a mesajului informațional.

Extremități complementare la DNA - sunt extremitățile libere ale catenelor de dc-DNA rezultate prin clivarea moleculară (fragmentarea, secționarea sau excizia - termenii prezintă sinonimie, neexistând încă convenții de unificare a terminologiei) produsă de endonucleaze la catenele izolate de dc-DNA, lăsând intact restul de dc-DNA duplex. După excizia catenelor se formează "extremități complementare ale dc-DNA" care pot fi: a) integral complementare - cu "extremități netede" - în cazul excziei pe axa de simetrie; b) parțial complementare - cu "extremități coezive" sau "capete coezive" în cazul exciziei paracentrice în raport cu axa de simetrie.

Exonucleaze - clasă de enzime care produc "clivarea" (i.e. "excizia") unei catene de acid nucleic (DNA sau RNA) din aproape în aproape. Excizia poate porni de la o extremitate sau de la ambele extremități ale catenei.

Fenotip (gr. phaino-apariție; typos-tip, model) - concept care definește totalitatea caraterelor morfologice, fiziologice, biochimice și comportamentale ale unui organism. Fenotipul este - în general - considerat ca o expresie a interacției existente între genotip și mediu. Noțiunea de caracter (gr. kharakter-semn gravat) în definirea fenotipului are un sens mai complex, acela de "trăsături distinctive" referitoare la forma anatomică, structura chimică, activitatea biologică, culoare, aspecte comportamentale etc. Se mai impune precizarea că fenotipul are trăsături dinamice, relevând modificări în cursul existenței individului. În definirea fenotipului - prin extensiune - s-a acreditat și definirea caracterelor normale și patologice. Acestea pot fi consecința unor perturbări ereditare (boli congenitale) sau efectelor mediului extern și/sau intern (boli dobân-dite). Mutațiile, ca perturbări induse de agenții fizici, chimici sau biologici, operează, de asemenea, asupra fenotipului unui organism.

Gena, pl. gene (gr. gennaein -a da naștere sau genos - urmaș) se definește în raport cu "sistemul de referință", i.e.: a) în biologia și genetica celulară conceptul de "genă" introdus de Johanssen (1903) - a substituit termenul clasic de "element

ereditar" sau "factor ereditar" - pentru a defini particulele materiale existente în structura masei ereditare care pot condiționa manifestarea unuia sau mai multor caractere ereditare; b) în biologia şi genetica moleculară conceptul de genă se defineşte ca un ansamblu de secvențe nucleotidice dintr-o moleculă de acid nucleic: DNA (eucariotic, procariotic, viral) sau de RNA (viral), moleculă care conține informația necesară pentru sinteza unei catene polipeptidice specifice (în cadrul procesului de transcripție-translație).

Genom (gr. genos-urmaş) - totalitatea genelor prezente într-un set cromosomial haploid (n) - de proveniență paternă sau maternă (în cazul eucariotelor). În genom se regăseşte setul de gene al unui genotip - set în care fiecare genă constituentă este reprezentată o singură dată. Deci, un organism diploid - două genoame (paternal şi maternal); un organism poliploid - "n" genoame. În accepția actuală conceptul de genom are conotații mai ample referindu-se la acidul nucleic coreal (DNA sau RNA) de la virusuri, la dc-DNA genoforal din nucleoidul procariotic şi dc-DNA cromosomal din nucleul eucariotic. La procariote se mai are în vedere dc-DNA plasmidal din plasmide. La eucariote se include dc-DNA extra-cromosomal care poate fi dc-DNA din mitocondri (mt-DNA) şi dc-DNA din cloroplaste (cp-DNA).

Genotip (gr. gennaein-a da naştere; typos-tip, model) - concept care defineşte constituția genetică a unui organism. Genotipul este reprezentat prin totalitatea genelor organismului luat în studiu. Sinonimul idiotip (gr. idios-personal; typos-tip, model) - defineşte, de asemenea, constituția genetică individuală, specifică unui anumit organism.

Haploid (gr. haploos-simplu; eidos-formă, aspect) - număr de cromosomi caracteristic gonocitelor (celulelor sexuale) constând într-un singur set de cromosomi. Se notează uzual prin litera "n". Numărul haploid (n) de cromosomi este denumit uneori şi "număr genetic" şi se evidențiază în meioză.

Heterozigot (gr. heteros-altul; zygotos-împreună) - celulă sau organism diploid care prezintă pe un locus specific două gene diferite, e.g.: o genă normală şi o genă mutantă. Mutațiile cromosomiale cunoscute ca "recesive" pot determina, în forma heterozigotă, tulburări clinice manifeste. Se estimează că frecvența acestora poate fi de 3-16%. În anumite cazuri prin heterozigoție pot apare forme patobiochimice (de biochimie patologică), e.g.: enzimopatii, hemopatii. Studiul acestora s-a intensificat în ultimii ani ca o consecință a cartării genomului uman.

Heterozigoție (gr. heteros-altul; zygotos-împreunare; osis-condiție) - prezența condiționată a cel puțin unei perechi de gene (alele) diferite în doi loci homologi aparținând unei perechi de cromosomi homologi.

Hibridizare moleculară (lat. hibrid-metis) - metodă specifică biologiei moleculare, bazată pe disocierea şi fragmentarea dc-DNA şi reasocierea cu fragmente de mc-DNA sau RNA. Hibridizarea se bazează pe complementaritatea nucleobazelor (bazelor), i.e. A-T sau A-U şi G-C. Ca proces de asociere sau reasociere hibridizarea se poate realiza in-

traspecific sau interspecific. Produşii rezultaţi sunt de tipul DNA-DNA, DNA-RNA sau RNA-RNA.

Hibridizarea moleculară in situ - metodă de hibridizare care desemnează asocierea directă a unei sonde moleculare cu DNA sau RNA excizat pe căi citologice sau din cromosomii metafazici. Această metodă se pretează şi utilizării la desemnarea procedeului de detectare a coloniilor de bacterii în care au avut loc procese de recombinare.

Homozigot (gr. homos-acelaşi, asemănător; zygotos-împreunat) - celulă sau organism diploid care prezintă două gene identice pe acelaşi locus. În eredopatologie - interesând bolile înnăscute de metabolism - pot să apară mutaţii recesive în formă homozigotă.

Homozigoţie (gr. homos-acelaşi; zygotos-împreunare; osis-condiţie) - prezenţa unor gene (alele) identice pe loci homologi, în aceeaşi pereche de cromosomi, deci în cromosomii

Insert (engl. to insert-a insera, a introduce) - denumire consacrată pentru a desemna un fragment de DNA exogen, care s-a introdus, prin recombinare, într-un anumit vector.

Introni - secvenţe de DNA transcrise şi ulterior eliminate prin episaj (splicing) în cursul maturării RNA.

In vitro (lat. vitrum-sticlă) - noţiune care defineşte reproducerea unor procese sau experimente biologice în "mediu artificial" - în afara organismului. În acest mod au fost investigate numeroase probleme de biologie moleculară şi biochimie, urmărind căile biochimice, specifice unor procese ana- şi/sau catabolice, e.g.: recombinarea genică, mutageneza (chimio- sau radioindusă) etc.

In vivo (lat. vivos-viu) - noţiune care defineşte studiul proceselor biologice sau experimentelor care au loc în organismul viu sau în celulă. Astfel de studii - urmărind probleme de biologie moleculară, biochimie, genetică, patologie biochimică (patobiochimie) etc.- se intreprind, în mod curent, pe animale de laborator.

Linkaj sau **legătură genetică** (engl. linkage; fr. liaison genetique) - cosegregare a două sau mai multe alele - în cursul generaţiilor - în raport cu proximitatea fizică a locilor din genom. Gradul de linkaj (legătură genetică) - măsurat prin procentajul de recombinare între loci- implică o "distanţă genetică" care se poate exprima în centimorgani (cM).

Locus, pl. loci (lat. locus-loc) - amplasament al unui fragment de DNA (într-un cromosom), caracterizat printr-o genă sau un segment genic care este sau nu este polimorf, i.e. segment anonim. Noţiunea conexă de locus morbid caracterizează o regiune genică în care se cantonează o anomalie a unui fragment de DNA şi care poate antrena o boală ereditară monofactorială.

Marker genetic (engl. marker genetic; fr. marquer genetique) - mijloc genotipic, e.g. un anumit RFLP sau fenotipic, e.g. o anumită enzimă care permite reperarea unei celule sau chiar a unui cromosom. Markerii permit selecţionarea eficientă a clonelor celulare particulare (mutantele).

Meioza (gr. meio-a micşora; osis-condiţie) - tip de diviziune celulară în urma căreia rezultă două celule specializate

(gonocite) care au doar jumătate din numărul de cromosomi în raport cu celula-mamă (celula somatică). Deci, gonocitele (spermatozoizi, ovule) formate prin meioză au un număr haploid (n) de cromosomi, în raport cu celulele somatice în care există un număr diploid (2n) de cromosomi. Meioza, ca tip de diviziune, a fost presupusă de Weismann (1887), dar a fost confirmată prin studii efectuate pe plante, de către Strassburger (1888). În meioză se disting de fapt două diviziuni celulare particulare care constituie stadiile ultime ale gametogenezei: primul - în cursul căruia se produce recombinarea - denumit diviziune ecuațională (2n.....2n); secundul - în cazul căruia are loc reducerea numărului de cromosomi - denumit diviziune reduc-țională (2n.....n). Se consideră că meioza are, în esență două funcții distincte: segregarea independentă a cromosomilor şi recombinarea genetică prin crossing-over. Aceste funcții sunt importante în variabilitate.

Microinjectare - metodă prin care se introduce "prin injectare" o soluție cu conținut de DNA, proteine sau alte materiale solubile într-o celulă-gazdă. Pentru microinjectare se utilizează o micropipetă capilară din sticlă efilată fin. Această metodă se pretează utilizării în cercetările de inginerie genetică pe celule-gazdă (celule-recipient) de la animale (mamifere, pești).

Mitoza (gr. mitos-filament, fir; osis-condiție) - tip de diviziune specifică celulelor somatice, în urma căreia se formează două celule fiice care au același număr de cromosomi ca şi celula mamă. Termenul de mitoză a fost utilizat în această formă de Strassburger (1880), care a introdus şI termenul de cromatină. Pentru deinirea mitozei s-a utilizat şi termenul de cariochineză (gr. karion-nucleu; kinesis-mişcare) introdus de Schleicher (1979). Ulterior studiul fotonomicroscopic al diviziunii longitudinale a "filamentelor nucleare" a condus la denumirea de "cromosomi" dată de Waldeyer (1888) acestor fragmente.

Modificație (lat. modificatio-măsurare) - în accepția Biologiei moleculare - caracteristică a organismelor bacteriene, care rezidă în producerea de enzime cu rol în modificarea propriului "DNA" spre a fi protejat împotriva acțiunii "propriilor enzime" de restricție. Acțiunea sistemului de modificație se obiectivează prin metilarea unor secvențe specifice ale DNA, care nu mai pot fi recunoscute şi nici excizate de enzimele de restricție.

Nucleobaze sau baze azotate heterociclice - sau simplu baze- derivați pirimidinici (citozina-C, timina-T, uracilul-U) şi purinici (adenina-A, guanina-G) prezenți în constituția DNA şi RNA. Uzual, pentru simplificare, se denumesc "baze" şi se evaluează cantitativ pentru a caracteriza acidul necleic, e.g.:

-kilobaze (kb) - 1000 perechi de baze în cazul dc-DNA şi 1000 baze în cazul mc-RNA

-megabaze (Mb) - 1.000.000 perechi de baze în cazul dc-DNA.

Nucleosom - structură poliheteronucleotidică - specifică structurii terțiare- prezentă în cromatină, constituită dintr-un octamer histonic şi ccca 140 pb din DNA circumscrise ("bobinate") la octamer.

Ochre - mutaţie prin care se formează un codon non-sens UAA, în secvenţa codantă a unei gene. Acest codon de tip STOP sau TER poate întrerupe traducerea mesajului informaţional (v. de asemenea Ambre şi Opal).

Opal - mutaţie care poate conduce la formarea codonului non-sens UGA. Codonul astfel format este simbolizat prin STOP sau TER şi determină întreruperea traducerii mesajului informaţional (v. de asemenea Ambre şi Ochre).

Oncogene - termen care, în accepţia ori-ginală, desemna gena capabilă de a produce (experimental) un fenotip canceros. Oncogenele sunt gene transformante pentru celule eucariote normael. De la acestea poate porni procesul cancerigen (tumorigen). Primele oncogene descoperite au fost genele unor retrovirusuri fiind cunoscute în literatura de specialitate sub denumirea de "oncogene virale" şi prin notaţia n-onc. Prin extensiune, toate genele celulare care sunt susceptibile la modificări calitative şi/sau cantitative şi pot deveni gene transformante sunt desemnate prin termenul generic protooncogene şi se notează prin c-onc. Acestea pot, în timp, conduce la procese carcinogene.

Oncoproteine - proteine sintetizate de codoni care aparţin unor oncogene.

Operon - unitate de expresie a genelor bacteriene constituită din gene de structură (cistroni), de secvenţe cis (operator, promotor) şi de factori transregulatori (represori).

Organism modificat genetic (OMG) sau **organism transgenic** - organism (aparţinând regnului vegetal sau animal în al cărui genom au fost induse modificări, prin mijloace specifice ingineriei genetice. Ulterior, pe căi specifice eredobiologiei (i.e. repro-ducerea celulară), modificările se transmit descendenţilor

Palindrom sau **secvenţe palindromice** - catene de DNA complementare în care secvenţa este indicată prin scrierea nucleobazelor pe o catenă de la stânga la dreapta, iar pe altă catenă de la dreapta la stânga. Spre exemplu:

GAATTC - în catena a
CTTAAG - în catena b

Secvenţele recunoscute prin enzi-mele de restricţie (de tip II) sunt "secveţe palindromice" sau "palindromi". Cunoaşterea acestor secvenţe este importantă în tehnologia DNA recombinat.

Permisivitate - concept care defineşte condiţiile necesare multiplicării unui microorganism. Termenul este frecvent utilizat în biologia celulară şi moleculară, fără a fi un termen "consacrat" (specific) pentru acest domeniu. Exemplificări: temperatura reprezintă o condiţie de permisivitate pentru o şuşe de microorganisme care prezintă termosensibilitate (scăderea temperaturii opreşte multiplicarea); pH-ul poate reprezenta o condiţie de permisivitate pentru o celulă-gazdă (celulă permisivă) în acre accede un virus; presiunea parţială a oxigenului (notată curent p_{O2}), poate reprezenta un alt criteriu de permisivitate pentru o şuşe de microorganisme.

Plasmide (gr. plasma-formaţiune) - secvenţe de deoxiribonucleotide din fragmente de DNA extracromosomial circular care sunt prezente în celule procariotice (e.g. Escherichia coli) şi chiar eucariotice

(e.g. Drosophila melanogaster, Zea mays). Plasmidele conţin un DNA într-un număr redus de gene implicate în diverse procese metabolice legate de: fertilitate, antibiorezistenţă, rezistenţa la radiaţii ultraviolete (RUV), oncogenitate, fenomenul de restricţie şi modificaţie etc. Plasmidele - i.e. DNA plasmidal- se utilizează în mod curent ca vectori în tehnologia DNA recombinant.

Poliribosom (gr. polys-mulţi; ribos-boabă; soma-corp) sau **polisom** - reprezintă un agregat constituit din mai mulţi ribosomi care asigură sinergizarea funcţională.

Primer sau **amorsă** (engl. primer; fr. amorce) - secvenţă scurtă de DNA sau RNA care este complementară zonei de debut a fragmentului de DNA matrice. Primerul serveşte pentru iniţierea recopierii fragmentului de acid nucleic în prezenţa unei polimeraze.

Procedeu de tip blotting - procedeu analitic care desemnează etapa de transfer a macromoleculelor (acizi nucleici sau proteine) de pe un gel pe o membrană la nivelul căreia se fixează.

Promotor - regiune a DNA în amonte de genela care se comportă ca o zonă de fixare a RNA polimerazei, asemănător părţilor de fixare a proteinelor regulatoare pentru transcripţie.

Provirus - genom retroviral integrat sub forma unui fragment de DNA dublu catenar în catena DNA din celula-gazdă.

Reacţia în lanţ a polimerazei (engl. Polymerase Chain Reaction-PCR; fr. amplification elective in vitro) - metodă de amplificare selectivă in vitro a unui fragment de dc-DNA prin extensia iterativă cu ajutorul a doi primeri dispuşi în proximitatea catenei DNA dc. Astfel în relaţiile primer-DNA mc (realizate pentru fiecare din catene) se realizează repetiţia ciclică în succesiunea: 1) denaturare DNA; 2) hibridizare primer-DNA; 3) extensie DNA. În final are loc duplicaţia exponenţială a fiecărei catene.

Recombinare genetică in vivo - rezidă în recombinarea secvenţelor de deoxiribonucleozidfosfaţi (dNMP) ale DNA pe cromosomi de acelaşi fel, rezultând un schimb de "material genetic" - între cromosomi homologi în cursul meiozei (crossing-over). Prin extensiune, noţiunea de recombinare genetică in vivo, desemnează şi rearanjamentul secvenţelor de deoxiribonucleotidfosfaţi în cadrul unui anumit cromosom (cazul genelor implicate în procesele imunitare). În accepţia dată în volumul de faţă aceasta este "recombinarea genică naturală".

Recombinarea genetică in vitro - rezidă în "asamblarea" în condiţii experimentale a secvenţelor de deoxiribonucleozidfosfaţi (dNMP) ale DNA care prezintă non-contiguitate în stare nativă. Accepţia dată în volumul de faţă este aceea de "recombinare genică mediată biotehnologic".

Repetiţia în tandem - serie de secvenţe identice - constituite din resturi deoxiribonucleotidmonofosfaţi (dNMP) - care se repetă consecutiv pe aceeaşi catenă de DNA.

Restricţie (lat. restrictio-restricţie) - în accepţia Biologiei moleculare - modalitate de distrugere (excizie) enzimatică prin endonucleazele de restricţie, a DNA bacteriofagal al unui fag infectant pentru o anumită bacterie. Acţiunea unui sistem

de restricție se obiectivează prin faptul că la bacteriile infectate nu se produce liza.

Retrotranscripție - sinteză realizată în prezența enzimei revers-transcriptaza prin acre se obține o moleculă de DNA complementar (cDNA) pornind de la o moleculă de RNA.

Ribosomi (gr. ribos-boabă; soma-corp) - formațiuni (organite) citoplasmatice dispuse pe fața externă a reticulului endoplasmatic sau libere în citoplasmă. Structural - ribozomii sunt formați din acizi nucleici (RNA) și proteine de diverse dimensiuni și mase moleculare. (Proteinele intervin în asamblarea și menținerea structurii ribosomilor). Morfologic - fiecare ribosom este constituit din două subunități: minoră și majoră care diferă prin constanta de sedimentare (cs) exprimată în unități Svedberg (S). La procariote există ribosomi cu subunități de 30S și 50S, iar la eucariote subunitățile cu mărimea de 40S și 60S. Funcțional - ribosomii intervin în procesul de translație a informației realizată prin intermediul acidului ribonucleic mesager (mRNA). Cu referire la conceptul de "ribosom" se impune o precizare de ordin etimologic - care de altfel reiese din text - și care explicitează modul de scriere corect. În etimologia acestui termen există cuvinte latine ribos-boabă și soma-corp, care justifică scrierea expresiei de "ribosom". Cuvântul "riboză" - care denumește o pentoză (deci o "oză" cu cinci atomi de carbon) - nu se află în etimologia noțiunii discutate, ceea ce face eronată utilizarea expresiei de "ribozom" în limba română (p. conf. a se vedea și literatura de specialitate din limbile cu fond lexical latin și limbile cu fond lexical germanic).

RN-aze sau ribonucleaze - enzime care produc secvențializarea prin "excizie" ("clivare") la catenele de RNA. În prezent se cunosc două tipuri de RNA-aze:

a) RN-aze A - ribonucleaze care detectează și clivează RNA la nivelul anumitor legături internucleotidice eronate din RNA mc. S-a constatat că RN-aza A este inactivă în cazul existenței unor structuri dicatenare în care apare RNA;

b) RN-aze H - ribonucleaze care produc "excizia" în secvențele de RNA prezente în moleculele rezultate prin hibridizare, de tipul RNA-DNA.

Sintaza -enzimă care catalizează o reacție de sinteză fără participarea ATP sau a unui alt compus macroergic. Sintazele aparțin clasei enzimelor numite liaze (EC 4.)

Sintetaza - enzimă care catalizează o reacție de sinteză cu participarea ATP sau a unui alt compus macroergic. Sintetazele aparțin clasei enzimelor numite ligaze (EC 6.). Deci, interacțiile catalizate de ligaze necesită prezența unui compus macroergic (de obicei ATP). Ligazele catalizează formarea de legături între carbon (C) și atomi de O, S, N, reacția fiind cuplată cu hidroliza legăturilor macroergice.

Splicing sau **episaj** (engl. splicing; fr. epissage) - mecanism molecular care rezidă în excizia intronilor și rearanjarea consecutivă (minifragment cu minifragment) a exonilor în cursul perioadei de maturare și transcriere

Taq polimeraza - DNA polimerază termorezistentă extrasă de la bacteria Thermus aquaticus. Această enzimă este utilizată pentru amplificarea unui fragment de DNA prin reacţia în lanţ a polimerazei (PCR), la temperaturi ridicate (enzima rezistă la temperaturi de cca 90°C).

Transformare Fourier - procedeu mate-matic utilizat pentru evaluarea - prin conversie - a datelor obţinute prin studii cristalografice cu raze X într-un sistem de prezentare "a cartei" densităţilor electronice

Transgena - gena provenită de la un organism, transferată - prin mijloace specifice ingineriei genetice - în genomul altui organism

Transgeneza sau **transferul de gene** - proces care rezidă în introducerea unei (unor) gene, care provine (provin) de la alt(e) organism(e)

Transgenic (lat- trans-de cealaltă parte; gr. genos-urmaş) - organism vertebrat în al cărui genom a fost încorporat stabil un fragment de DNA, i.e. o genă (denumită "transgenă"). Încorporarea în genom se face timpuriu - în perioada dezvoltării embrionare. Transgena va fi prezentă atât în celulele somatice cât şi în celulele germinale şi se exprimă în unul sau mai multe ţesuturi. Incorporarea genei face ca aceasta să se exprime de o factură mendeliană.

Transgenicitate - concept care defineşte obţinerea de animale transgenice. Animalele transgenice (e.g. în experi-mente efectuate îndeosebi pe şoareci) se obţin din ovocite fecundate în care s-a transferat o secvenţă de DNA exogen (clonat) şi care a fost integrat genomului propriu al ovocitei fecundate. Transgenicitatea poate fi considerată ca un transfer de gene (i.e. de DNA), mediat cromosomial, de la o celulă la alta.

Vector, vehicul sau **navetă** (engl. vector; fr. vecteur ou navette) - secvenţă ribonucleotidică dintr-un fragment de DNA, care are capacitatea de replicaţie autonomă (independent de cromosomul mediului de proveniență). Având capacitatea de amplificare - prin autoreplicaţie - extracromosomială (i.e. clonaj), vectorul poate fi utilizat pentru amplificare in vitro. Drept vectori se utilizează în prezent: plasmide, virusuri şi cosmide.

Zigot (gr. zygotos-împreunat) - celulă rezultată prin fecundare în urma amfimixiei pronucleilor gonocitelor paternală-spermatozoidul şi maternală-ovula. În urma acestei "fuziuni" a gameţilor parentali noua celulă-zigotul-va avea un număr diploid (2n) de cromosomi.

INDEX DE SUBIECTE

A

Acid deoxiribonucleic (DNA)
- al cloroplastelor 253
- amplificare 317u
- bacteriofagal 374u
- circular 206u
- complementar 227
- complementaritate 191, 294, 474
- compoziţie în nucleobaze 188
- configuraţie 197
- conformaţie 197
- coreal 19, 249u, 255
- cromosomal 32, 247, 253, 277, 355, 372, 375
- cu dextrorotaţie 197, 205
- cu senestrorotaţie 197, 202, 205
- denaturare-renaturare 193, 295
- disociere şi asociere 297u
- dicatenar 249, 294
- extracromosomal 247, 253
- forţe intramoleculare specifice 204
- genoforal 32, 247, 251, 323
- genomic 375
- hibridizare 295u
- legături de hidrogen 182
- linear 206u
- matrice 230, 250, 262
- mitocondrial 49, 227, 247, 253
- monocatenar 249, 294
- parametri sterici 200
- parametri lineari 200
- parametri angulari 200
- pasager (ţintă) 370, 376,426
- plasmidal 224, 251, 247, 351, 371, 375
- plastidal 247
- recombinant 224, 346, 358u, 380, 398, 408, 418
- structura chimică 184
  - primară 185
  - secundară 190
  - terţiară 193
  - cuaternară 196
- structura dublu-helicoidală v. Helix
- unghiuri conformaţionale 198
- transgenic 415

Acid fosforic 169, 179

Acid ribonucleic
- structură chimică 210
  - primară 21
  - secundară 212
  - terţiară 213
- disociere şi asociere 297u
- ribonucleic coreal 250
- ribonucleic mesager (mRNA) 216, 227, 272, 277, 294, 317, 321, 338, 442
- ribonucleic nuclear scurt (snRNA) 221
- ribonucleic ribosomal (rRNA) 220, 227, 231
- ribonucleic de transfer (tRNA) 217, 231

Aditivi alimentari 462u

ADP 48

Aducţi la DNA 482, 485, 493, 496

BCU CLUJ "LUCIAN BLAGA" UNIVERSITY LIBRARY

Agenţi antineoplazici 491u, 497
Agenţi chimioterapici 489
Aflatoxine 468u, 483
Amiloplaste 56
Amprenta DNA 325, 334
Anticanceros 489
Anticodon 214, 219
Antiparalelism 190, 474
Aparat fotosintetizant 37
Aparat genetic 193
Aparat de translaţie 276
Apoptoza 55, 86
ATP 48, 292u
Autoradiografia 117, 291u
Auxotrofi (mutanţi) 113
Azotiperite 490, 492u

B

Bacterii
- Gram pozitive 38
- Gram negative 39
Bacteriofagi 227, 249, 342, 371u
Bariere membranare 63
Baze azotate heterociclice v. Nucleobaze
Beer Lambert (lege) 130, 135
Bioritmuri
- autonomie 451u
- ultradiene 445
- circadiene 445
- infradiene 448
- condiţionare 444
- parametri 450
- periodicitate 443
- sincronizare 451u
Biosinteza proteinelor 280, 286
Biotehnologii 190, 342, 357, 405u, 426u
Bragg (relaţia) 137

C

Capsida 17, 20, 248
Carcinogeneză 57, 187, 225, 472u, 487
Cartare genom 326, 351, 354
Celule
- canceroase 490
- eucariotice 32, 41u, 46
- procariotice 27u, 32, 46
- tumorale 490
Centrifugare 46, 106, 150u
Centrosom 55
Chimioterapie citostatică 225, 472, 489u, 497
Ciclu de amplificare 319
Ciclu celular 82u
Ciclu litic 24
Ciclu lizogenic 25
Ciclofosfamida 490, 492u
Cisplatina 492u, 497
Citogenetica 430
Citoplasma 32
Citocinetica 489
Citostatice 433
Citoschelet 57
Citosol 32
Clonaj de gene 227
Clonare DNA recombinant 380
Cloroplaste 56
Criste 47
Cod genetic 179, 224, 231, 294
- degenerare 275
- diversitate 274
- universalitate 272
- univocitate 274
Codon 272u
- cu sens 275
- eronat 275
- nonsens 275

BCU CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Coeficient de extincţie 129u
Colagen 80
Complecşi ai DNA 493, 496
Complementaritate 191
Constante de sedimentare 33, 270
Contaminanţi alimentari 459
Core 19
Cosmide 371, 375
Cromatina 194, 196, 479
Cromatografie 118u, 310
Cromoplaste 56
Cromosomi 32, 196, 253u, 324u, 330, 350u,435
Cronobiochimia 441u, 489u, 497
Cronofarmacologie 489, 491, 498
Cronofiziologie 489
Cronotoxicologie 491, 498

D

Deoxiribonucleotide 174, 293
Deoxiribonucleozide 170, 261
Diagnostic prenatal 430
Dicroism circular 142
Difracţie cu raze X v. Spectroscopie
Dispersia optică rotatorie 142

E

Efect hipercromic 298
Elastina 80
Electroforeza 145, 293, 322
Endocitoza 64, 75
Endonucleaza de restricţie 361
Energogeneza 285
Entactina 81
Enzime 46, 94, 179, 230, 398u, 404
- de modificaţie (EM) 358, 364
- de restricţie (ER) 227, 310,323, 335, 358, 361u
- din grupa DNA ligazelor 368
- din grupa DNA polimerazelor 293,365
Etioplaste 56
Eucariote 7, 41u, 255, 354
Exocitoza 64, 77
Extincţie 129

F

Farmacocinetica 491
Farmatoxicolgie 498
Fenotip 253, 256, 295, 332
Fibrilina 80
Fibronectina 80
Filamente intermediare 57
Filiaţie moleculară 233
Fimbrine 38, 40
Flageli 38, 40
Formaţiune
- capitală 14, 17
- centrală 14, 17, 22
- terminală 14, 17, 23
Formaţiuni intracelulare 33, 251
Forţe de înstivuire 183

G

Gene 254, 258, 339, 354
Genetica inversă 331
Geniu genetic 224
Genofor 32
Genom 184, 245u, 255, 297, 438
- bacterian 35, 350
- celular 29
- la procariote 251, 255
- la eucariote 253
- mitocondrial 47, 179
- uman 224, 354u, 414
- viral 19, 248

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Genofond 255
Genotip 253, 255, 277, 295, 332
Glioxisomi 53
Glucide 59
Golgi (complex) 46, 52
Granule de depozitare 36

H

Helix 32,190u, 201, 203, 475, 478, 494
Hibridizare
- acizi nucleici 295
- in situ 297
- intraspecifică 288, 295
- interspecifică 288, 295
- in vitro 297
- in vivo 297
Hidrocarburi policiclice aromatice 225, 458, 465u, 470u, 483
Hormon somatotrop 393
Hormoni peptidici 390

I

Idiotip 255
Imunitate 414, 434
Imunomediatori 427
Informaţia genetică 229, 497
Ingineria genetică 357, 426
Insulina 90, 392u
Interferoni 431u
Interleukine 431u, 434
Ioni metalici v. Metale
Izotopi
- stabili 115u
- radioactivi 115u

K

Kilobaze 18, 226, 248, 321, 355

L

laminina 81
Legături chimice 181u
Leucoplaste 53, 56
Liganzi 492u, 496
Liza 342
Lizosomi 54

M

Magnetosomi 38
Manipulare genetică 226
Marker 313, 333, 431, 436u, 491
Matricea extracelulară 78u
Medicamente 489u, 492, 495
Medicina legală 325
Membrană celulară 38, 58
Meselson şi Stahl (experiment) 262u
Metale (în sisteme biologice) 127, 135, 190, 201, 469
Metode în Biologia moleculară
- de detectare prin sonde moleculare 288, 310
- de hibridizare 288, 295
- Maxam şi Gilbert 288, 290
- Northern 316
- PCR 288, 317u, 325
- RTLP 288, 327u, 316
- Sanger, Nicklen şi Coulsen 288, 292
- Southern 288, 314, 316
Metode analitice metabolice 113
Metode cromatografice 118u
Metode enzimatice 188
Metode izotopice 114u
Metode stereochimice 141u
Metode spectrometrice 122u
Mezosom 34
Microfilamente 57

BCU IASI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Microscopie 47, 94u
Microtubuli 57
Mijloace operatoare 358
Mitocondrii 47, 277
Mitoză 83
Mutageneza 187, 204, 225, 429, 462, 485
Mutanți v. Auxotrofi

N

Necroza 85u
Neoplazic 491
Neoplasm 491
Nitrogenaze 410
Nivele de filiație 409
Nucleobaze 188, 194, 235
- cu incidență redusă 164
- purinice 163
- pirimidinice 162
Nucleoid 27, 31
Nucleol 45
Nucleoproteide 179u, 491
Nucleosom 45, 194u
Nucleotide 173u
Nucleozide 170u
Nucleotidpolifosfați 176u
Nucleu celular 45

O

Oncogeneză 157, 201, 472, 485, 492
Oncologie 331, 324
Oncoterapie 492
Organele 47
Organisme modificate genetic (OMG) 418
- în agricultură 421
- în zoocultură 422
Operon 250, 267
Organite celulare 47
Osmoză 64u

P

Palindrom 296
Pasager 376, 394u, 408
Patologie
-biochimică 86, 106
-celulară 106
-electronică 237
-moleculară 106, 237
Peplos 17, 21, 248
Peroxisomi 53
pH izoelectric 146
Pili 38, 40
Plasmide 35, 371
Plastide (Proteide) 55, 277, 489
Polinucleotide 178
Polimeraze
- DNA-polimeraza 261, 320
- DNA-polimeraza DNA dependentă 365
- RNA-polimeraza 321, 367
- DNA-polimeraza RNA dependentă 367
Polipeptide 22
Poliribosomi 50, 271
Poluanți chimici alimentari 449, 457
Preparate enzimatice 456
Procariote 7, 27u, 32, 36, 255
Procese de
- carcinogeneză 57, 187, 225
- mutageneză 187, 204, 225
- teratogeneză 204, 225
- oncogeneză 157, 204
Program genetic 258

R

Recombinare
- genică 90, 335, 341u, 350
- in vitro 227u
- la virusuri 342

BCU CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

- la eucariote 354
- la procariote 342
- mediată biotehnologic 357
- naturală 341
Renaturare 193
Replicaţie 46, 230, 260, 475, 495, 497
Reticul endoplasmatic 49
Reverstranscriptaza 227, 433, 435
Ribonucleaza 107
Ribonucleotide 174, 209
Ribonucleozide 170
Ribosomi 33, 46, 49, 270
Ribovirioni 17
Ribovirusuri 17, 19
RNA v. Acizi ribonucleici

S

Secvenţe palindromice 296
Secvenţializare DNA 227, 322, 439
Senescenţă 449u
Sexducţia 350
Sisteme de transport 64u
Somatostatina 391, 394
Sonde moleculare 288, 310, 322, 324
- chimiomarcate 288, 313
- radiomarcate 288, 312u
Spectrometria
- de absorbţie 124u, 138
- de difracţie cu raze X 135u, 138
- de emisie atomică 124u, 138
- de fluorescenţă atomică 124u, 139
Structuri electronice la nucleobaze 235

T

Tanatocitoza (v. şi Apoptoză, Necroză) 84
Tautomeria 166u, 187
Transgene 418
Transgeneza 419u
Taxonomie biochimică 233, 297
Tehnologia DNA recombinant 17, 106, 358, 395, 410
Tenascina 81
Terapia genică 429
Teratogeneză 204, 225, 485
Transcripţie 46, 106, 265u, 427, 475, 497
Transfer de gene în relaţie cu:
- cosmide 335
- plasmide 336
- virusuri bacteriene 335, 342
Transcriere in vitro 227
Transducţie 351, 410
Transfecţie 24
Transmitnţă 129
Transport transmembranar 65u
Translaţie 46, 269u, 427, 497

U

Ultracentrifugare 47, 106
Ultrastructura 15, 42, 47, 155
- eucariotelor 41
- procariotelor 27
- virusurilor 14

V

Vaccinuri 428u
Vacuole 36, 57
Vector 36, 352, 370, 378, 415, 426
Virion 16
Virusuri 5, 14, 16, 93, 342, 416, 432
- temperate 24
- virulente 25

X

Xenobiotice 459u, 462

BCU IAŞI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

BCU IASI/CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

BCU IASI/CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

ADDENDUM

BCU IASI/CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

BCU IAS/CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Acad. Nicolae CAJAL
1 octombrie 1919 - 7 martie 2004

Acad. Nicolae CAJAL : n.1 octombrie 1919, Bucureşti; medic; doctor în medicină; doctor docent în ştiinţe; preşedintele Secţiei de Ştiinţe Medicale a Academiei Române; director onorific al Institutului de Virusologie "Ştefan S. Nicolau" al Academiei Române, Bucureşti; preşedintele Fundaţiei Familiei "Menachem H. Elias"; preşedintele Academiei de Ştiinţe Medicale; preşedintele Federaţiei Comunităţilor Evreieşti din România; membru titular al Academiei Române din 1990 (corespondent - 1963)

(din vol. Academia Română - Anuar 2003, pag.49)

BCU MAS/CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

BCU IAȘI/CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

La trecerea în eternitate, se exprimă sentimente de adâncă compasiune şi pios omagiu in memoriam:

Acad. NICOLAE CAJAL

preşedinte al Secţiei de Ştiinţe Medicale a Academiei Române, preşedinte al Academiei de Ştiinţe Medicale (A.S.M.), director onorific al Institutului de Virusologie "Şt. S. Nicolau" Bucureşti.

Personalitate de reputaţie ştiinţifică internaţională, cu prestigioase responsabilităţi sociale şi remarcabil mentor, a sprijinit cu înaltă competenţă şi generozitate dezvoltarea de noi domenii ale ştiinţelor biomedicale, ale biochimiei şi biologiei moleculare ş.a.

De distinsa sa personalitate – între alte prestigioase contribuţii - se leagă: a) dezvoltarea în Timişoara cercetărilor în domeniul Biologiei moleculare în cadrul A.S.M. - Filiala Timişoara începând cu anul 1984, în Laboratorul de Embriologie (coordonat de Acad. Benedict Menkes); b) desfăşurarea – avizată de Acad. Cajal, în calitate de vicepreşedinte al Academiei Române (mandatul 1990-1994) - a Seriei de Simpozioane "Metalele în Mediu, Medicină şi Biologie", sub egida Filialei Timişoara a Academiei Române (preşedinte Acad.Toma Dordea), începută în 1993 cu periodicitate dienală – aflată în prezent la a 6-a ediţie. Sincere condoleanţe familiei îndoliate exprimă Prof. Dr. Gârban Zeno

din ziarul «Renaşterea Bănăţeană» Nr.4295, 12 martie 2004

BCU IASI/CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

BCU IASI/CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Tiparul executat la
"Eurobit" - Tipografie şi Editură
Aleea F.C. Ripensia Nr. 10
300.575 Timişoara
Tel. / Fax : 00 40 (0) 256 - 499-004

BCU IASI/CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

BCU IASI/CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

B.C.U. "M. EMINESCU" IAŞI

30 Rom 3237/05

BCU IASI/CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

DE ACELAŞI AUTOR
Publicații în volume (selectiv)

Gârban Z. - *Xenobiotice chimice de interes alimentar* (XLII+424 pag.), Editura Eurobit, Timişoara, 2004

Gârban Z. - Influence of metals on deoxyribonucleic acid, Chap.7, pp.401-414, in *"Elements and their Compounds in the Environment: Occurrence, Analysis and Biological Relevance"* Vol. I General Aspects (Eds.Merian E., Anke M., Ihnat M., Stoeppler M.), 2nd edition, Wiley-VCH Verlag GmbH & Co KgaA, Weinheim, 2004

Gârban Z., Gârban Gabriela, Avacovici Adina, Ahmadi-Vincu Mirela, Popescu Sofia-Georgeta, Aumüller Corina, Ehling Şt. – *Biochimie: Tratat comprehensiv. Vol. III*, ediția 2-a (XLVIII+460 pag.), Editura Didactică şi Pedagogică R.A., Bucureşti, 2004

Gârban Z., Drăgan P. (Eds.) - *Metal Elements in Environment, Medicine and Biology, Tome VI*, Romanian Academy – Branch Timisoara, Proceedings of the Sixth International Symposium, Timişoara, November 8-10, 2004 (368 pag.), Publishing House "Eurobit" Timişoara, 2004

Mânzatu I., Vior C.E., Jurcoane Ştefana, Pană C.O., Gârban Z., Popa V.I., Şonea A., Pop I.M., Bogdan A.T. – *Dicționar explicativ de biotehnologie*, Vol.1, Litere A-C (480 pag.), din Seria "Dicționar explicativ de Biotehnologie" Vol.1-8; Litere A–Z (Editori coordonatori Mânzatu I., Bogdan A.T.), Editura Global Bucureşti, 2003

Gârban Z., Gârban Gabriela – *Nutriția umană. Vol.I. Probleme fundamentale*, ediția 3-a (XXX+368 pag), Editura Orizonturi Universitare, Timişoara, 2003

Gârban Z. - *Biochimie: Tratat comprehensiv. Vol.II – Partea 1*, ediția 2-a (XL+302 pag.), Editura Didactică şi Pedagogică R.A., Bucureşti, 2002

Gârban Z., Drăgan P. (Eds.) - *Metal Elements in Environment, Medicine and Biology, Tome V*, Romanian Academy – Branch Timisoara, Proceedings of the Fifth International Symposium, Timişoara, November 4-6, 2002 (366 pag.), Publishing House "Eurobit" Timişoara, 2002

Gârban Z. - *Biologie moleculară: Probleme fundamentale şi aplicative*, ediția 4-a, (LIII+524 pag.), Editura Eurobit, Timişoara, 2001 (distinsă cu Premiul "Traian Săvulescu" al Academiei Române)

Gârban Z.- *Biochimie: Tratat comprehensiv. Vol.I,* ediția 2-a (LXXXVI+769 pag.), Editura Didactică şi Pedagogică R.A., Bucureşti, 1999

Gârban Z. - Implications of the chronobiochemistry - metabolism relationship in the induction of homeostasis changes: The action of the Mg^{2+} and Zn^{2+} ions on DNA. Chapter 71, pp.482-489, in *"Advances in Magnesium Research"* (Ed. Smetana R.), J. Libbey, London-Paris-Rome-Sidney, 1997

Gârban Z. – Acțiunea alcoolului asupra metabolismului embrio-fetal, pp.139-149, în *"Embrio- şi fetopatia alcoolică"* (Ed. Sandor S.), Editura Academiei Române Bucureşti, 1993

Gârban Z. – *Noțiuni de Biologie moleculară, Vol. I* – Concepte şi metode, ediția 1 (148 pag.), Editura Eurobit, Timişoara, 1992

ISBN: 973-620-159-7